



Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2016

Hjulsager, Charlotte Kristiane; Krog , Jesper S; Madsen, Jesper Johannes; Thorup, Kasper; Larsen, Lars E.

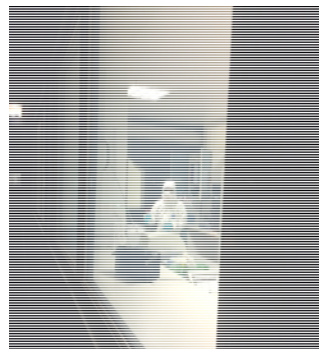
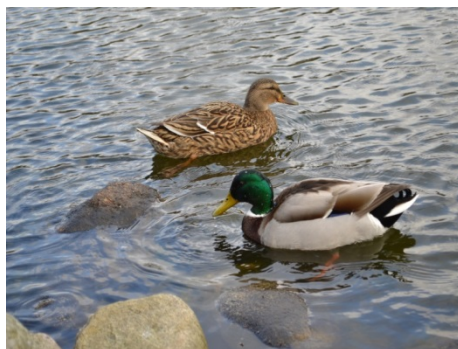
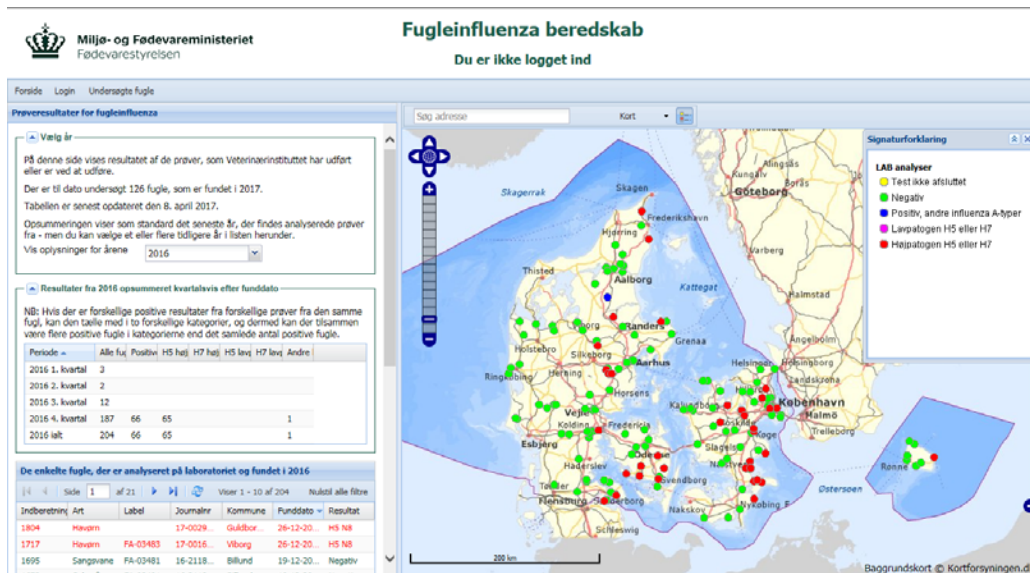
Publication date:
2017

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Document license:
[Ikke-specificeret](#)

Citation for published version (APA):
Hjulsager, C. K., Krog , J. S., Madsen, J. J., Thorup, K., & Larsen, L. E. (2017). *Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2016*. Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2016



Maj 2017

Charlotte K. Hjulsager, Jesper S. Krog, Jesper J. Madsen, Kasper Thorup, Lars E. Larsen.

DTU Veterinærinstituttet

Denne rapport beskriver resultaterne der er opnået i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2016". Overvågningen er udført af DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

2016 har været et specielt år, idet der har været udbrud af højpatogen fugleinfluenza i vilde fugle i Europa inkl., Danmark. Udbruddet startede i november og fortsatte ind i 2017. Nærværende rapport indeholder ikke en uddybende karakterisering af udbruddet, men data fra 2016 er beskrevet. Uddybende analyser er endnu ikke afsluttede og afventer flere data som tilvejebringes i 2017.

En stor tak rettes til indsamlerne af prøver fra vilde fugle i naturen, herunder de frivillige ringmærkere. Vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Klosterheden Vildt og Alpevej Vildtbehandling takkes for nedlagt fjervildtprøver. Private borgere takkes for så vidt angår døde fugle til den passive overvågning for fugleinfluenza.

Endvidere takkes laboranter og dyrlæger i PCR-diagnostik, virologi, serologi og patologi, Afdeling for Diagnostik og Beredskab, for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2016

Rapport, endelig version, august 2017

Af

Charlotte K Hjulsager, DTU Veterinærinstituttet

Jesper S Krog, DTU Veterinærinstituttet

Jesper J Madsen, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Kasper Thorup, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Lars E Larsen, DTU Veterinærinstituttet

Copyright: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse.

Forsidefotos: Oversigt over resultater fra den passive overvågning 2016, <http://fvst.gis34.dk/>.

Gråænder, af Nana Hjulsager Mathiesen. Håndtering af prøver i klasse 3 laboratorie, DTU-VET.

Udgivet af: Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C.

Sammenfatning og konklusion

Overvågning af fugleinfluenza, aviær influenza (AI), på EU niveau går tilbage til 2002, og Danmark er underlagt EU kommissionens bestemmelser for udformning af overvågningen, der har skiftet gennem årene i takt med indhøstede erfaringer.

I 2016 blev der udført passiv overvågning af døde vilde fugle, der blev fundet i naturen. Der blev testet 204 fugle. Der blev for første gang i Danmark påvist højpatogen aviær influenza (HPAI) virus subtype H5N8. Det første fund var i en død troldand fundet den 7. november i Stadsgraven ved Christiania, København, og var første fund i et efterfølgende større udbrud af HPAI i vilde fugle. H5N8 HPAI blev i alt påvist i 65 døde vilde fugle (1 duehøg, 1 ederfugl, 3 havørne, 1 hættemåge, 8 knopsvaner, 5 musvåger, 1 ravn, 1 sangsvane, 3 stormmåger, 9 svartbags, 4 sølvmåger, 28 troldænder) fordelt over hele landet i 2016. Desuden blev influenza A virus, som ikke var H5 eller H7 subtype, påvist i en stormmåge. De øvrige 138 prøver var negative for AI virus.

HPAI H5N8 blev også påvist i en hobby besætning i november 2016. Fund af HPAI H5N8 i vilde fugle fortsatte i 2017.

Molekylærphylogenetisk analyse af HA genet i HPAI H5N8 virus fundet i Danmark i 2016 viste, at disse virus var nært beslægtede med samtidige HPAI H5 virus fra andre europæiske lande. Virus adskilte sig imidlertid genetisk fra HPAI H5N8 fra vinteren 2014/2015, hvor der var enkelte fund af HPAI i fjerkræ og/eller døde vilde fugle i England, Tyskland, Holland, Italien, Ungarn og Sverige.

Der blev også udført en aktiv overvågning af AI virus i vilde fugle i Danmark i 2016. Denne blev udført i samarbejde mellem Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (DTU-VET), Fødevarerstyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet (SNM) i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2016" (bilag 4). I forhold til tidligere år var antallet af fugle reduceret fra 1000 til 900, og molekylær karakterisering af fundne virus var også reduceret. For den molekylære karakterisering betød det at kortlægning af andre subtyper udover H5/H7 var reduceret til subtypning af isolater. Kortlægning af andre subtyper end H5/H7 giver en øget viden om forekomsten af virus af andre subtyper under danske forhold, hvilket er vigtigt i forhold til at være forberedt på nye emerging AI virus.

I den aktive overvågning af levende vilde fugle blev i alt testet 921 fugle som 243 pools af kloaksvabere fra op til 5 fugle af samme art, fundet på samme sted og på samme tid. I lighed med proceduren i 2013-2015, blev prøverne udtaget fra enkelt dyr og sendt til laboratoriet, hvor de blev poollet inden test. Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og i Hovedstadsregionen. FVST varetog udtagelse af prøver fra 377 fugle fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt. Statens Naturhistoriske Museum (SNM) koordinerede indsamling af prøver fra 544 vildtlevende fugle.

De poollede prøver fra den aktive overvågning blev testet for AI virus på DTU-VET. I alt 50 pools (21 %) blev fundet positive for AI virus ved PCR. Af disse var 12 (24 %) lavpatogen AI (LPAI) H5 og 1 (2 %) LPAI H7. Andelen og antallet af positive pools i 2016 var på niveau med tidligere år. AI virus kunne dyrkes fra 11 (22 %) af de PCR positive pools, hvilket er på niveau med tidligere år.

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra den aktive overvågning i vilde fugle blev der fundet virus med følgende subtyper: H2N3 (n=2), H3N8 (n=3), H4N6 (n=1), H6N2(n=3), H6N? (n=1) og H12N5 (n=1). Alle isolaterne var fra svømmeænder, og repræsenterer tidligere påviste subtyper. Subtyperne H3N8, H4N6 og H6N2 er de subtyper, der oftest er påvist i vilde fugle i den danske overvågning gennem årene.

De poollede prøver fra den aktive overvågning blev ikke specifikt testet for tilstedeværelsen af aviær paramyxovirus (PMV), men ved dyrkning i æg for at isolere AI virus fra AI PCR positive pools, blev der

isoleret PMV fra 10 pools. Ligesom de foregående år viste mange pools sig at indeholde en blanding af flere virus, enten flere AI virus og/eller både AI og PMV virus.

For 2016 var det muligt at sammenligne et udbrud af HPAI med indsamlingen af prøver fra levende vilde fugle. I 4. kvartal blev over 186 dødfundne fugle testet, hvoraf der blev påvist H5N8 HPAI i 65 fugle (35%). I samme periode blev indsamlet prøver fra 678 levende vilde fugle, hvoraf der ikke blev fundet HPAI i én eneste prøve. Overvågningen har ikke afsløret, hvorvidt der indgår vilde fuglearter som raske smittebærere, muligvis fordi der kun er testet et meget begrænset antal fugle og fuglearter. Det er muligt at i det mindste nogle fuglearter dør hurtigt efter, de har fået H5N8 HPAI i udbrud, og dermed ikke kan flyve over større afstande, mens andre fuglearter kan være mindre modtagelige for udvikling af sygdom og dermed kan virke som smittebærere.

Fylogenetisk analyse af LPAI H5 gener fra virus påvist i 2016 viste, at disse var nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark de foregående år, samt med virus fra vilde fugle og fjerkræ i Europa. De var fjernere beslægtet med HPAI H5N8 fundet i Europa i 2014/2015 og 2016. Fylogenetisk analyse af HA fra LPAI H7 virus viste at de danske H7 virus ikke er nært beslægtede med den humanpatogene H7N9 virus variant fra Asien, der smitter fra fugle til mennesker. Danske LPAI H7 virus fundet i vilde fugle og fjerkræ de senere år er imidlertid nært beslægtede med hinanden og med LPAI H7 virus fra øvrige Europa.

Sekventering af H5 generne gav mulighed for at undersøge, hvor godt de anvendte RT-PCR assays, som er de samme der anvendes til diagnostik, matcher nutidige AI virus. Resultaterne fra analysen af de tre H5 specifikke RT-PCR assays viste, at de overordnet set er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, men for nogle af de anvendte tests var der kritisk mange mutationer i primer og/eller probe regionen. Dette understreger at det i rutinediagnostikken er nødvendigt at kombinere assays for at sikre påvisning af hele spektret af H5 virus. Endvidere understreger analysen vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov.

Formålet med den aktive overvågning var at foretage en screening for LPAI virus og at karakterisere de identificerede virus. Kortlægning af andre subtyper udover H5/H7 giver en øget viden om forekomsten af virus af andre subtyper under danske forhold, hvilket er vigtigt i forhold til at være forberedt på nye emerging AI virus. Som de foregående år, viste resultaterne fra overvågningen i 2016, at fuglearten er den mest betydende faktor for, at en given prøve er positiv. Den største andel af positive prøver blev som i tidligere år fundet i svømmeænder og hyppigst hos gråænder.

I lighed med 2014 og 2015, var overvågningen i 2016 udvidet med en molekylær karakterisering af de virus, der blev påvist både i vilde fugle og i fjerkræ, og dette bidrog til en dybere og mere præcis karakterisering af virus, så vi ret præcist ved hvilke virus varianter, vi har påvist. Dermed er opnået en god indikation af hvilke AI virus, der cirkulerer i Danmark, og en viden om at disse virus pt. ikke udgør en øget trussel mod den humane sundhed. Overvågningen viser dog, at der til stadighed cirkulerer LPAI H5 og H7 virus i den vilde fauna, som potentielt kan true dyresundheden, så der er fortsat et behov for at overvåge forekomsten af AI virus i fjerkræflokke.

2016 har på europæisk plan især været præget af udbrud med HPAI H5N8 i vilde fugle og fjerkræ i en lang række lande, og udveksling af virus mellem disse segmenter. Dette gælder også Danmark. Derudover havde vi fund af LPAI H7 og LPAI H5 i to gråandeflokke på hhv. Fyn (juli 2016) og i Nordjylland (august 2016), men der blev ikke observeret sekundære udbrud i den forbindelse. LPAI H5/H7 i fjerkræ er et sjældent fund i Danmark. Det seneste forrige udbrud var med LPAI H7N7 i 2013 i en gråandeflok ved Viborg. Alle disse tilfælde blev opdaget i forbindelse med virologisk screening af rutine overvågningsprøver i fjervildtopdræt.

Indholdsfortegnelse

Sammenfatning og konklusion.....	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Introduktion.....	6
Baggrund	6
Formål.....	9
Materialer og metoder	10
Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle.....	10
Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle	10
PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse	10
Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse	10
Resultater og diskussion.....	11
Passiv overvågning - døde vilde fugle.....	11
Aktiv overvågning – levende vilde fugle	13
Prøver	13
PCR resultater	14
Virusisolater.....	16
Prøver indeholdende flere virus	17
Sammenligning med resultater fra tidligere år	17
Molekylær karakterisering af AI virus.....	18
H5 evaluering af diagnostiske assays	18
H5 LPAI diversitet	18
H5 HPAI diversitet.....	20
H7 diversitet	20
H9 virus.....	21
AI virus i fjerkræ	22
Referencer	24
Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning	26
Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning	30
Bilag 3. Virusisolatoversigter	31
Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 PCR assays.....	32
Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2016.	34

Introduktion

Baggrund

Aviær influenza (AI) er en smitsom virusinfektion, som kan angribe alle fuglearter, og som er forårsaget af influenza A virus. Influenza A virus tilhører *Orthomyxoviridae* virusfamilien og har et negativ-sense, enkeltstrenget, segmenteret RNA genom. Influenza A virus kan inficere mange dyresarter inkl. mennesker, grise, heste og fugle. Vilde fugle af ordenerne *Anseriformes* (ænder, gæs og svaner) og *Charadriiformes* (måger, terner og vadefugle) menes at udgøre det naturlige reservoir for influenza A virus (Verhagen et al. 2011).

Influenza A virus udviser en stor diversitet. Mest udtalt er den genetiske og antigene variation af overfladeproteinerne hæmagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). Virus klassificeres ud fra den antigene variation af disse HA og NA proteiner. I fugle kendes 16 hovedvarianter af HA og 9 varianter af NA. De findes i mange kombinationer, og disse såkaldte virussubtyper (f.eks. H1N1, H5N1 og H7N3) anvendes i influenza A virus klassifikation og nomenklaturen. AI virus kan yderligere klassificeres på baggrund af deres patogene fænotype i kyllinger. Højpatogen aviær influenza (HPAI) er en akut systemisk sygdomstilstand i fjerkræ, hvor mortaliteten kan være op til 100 %. HPAI er med meget få undtagelser begrænset til virus af subtyperne H5 og H7, men det er ikke alle H5 og H7 virus, der er højpatogene. Alle andre aviære influenzavirus er lavpatogene (LPAI), og forvolder mildere eller ingen sygdom (Verhagen et al. 2011). Udvikling af sygdom efter infektion med AI virus er værtsafhængig, således at et givent virus i nogle arter giver kliniske symptomer, mens det i andre arter giver mildere symptomer eller slet ingen. LPAI virus forekommer enzootisk hos vilde fugle, mens kun få HPAI virus er enzootisk forekommende og kun udenfor Europa (f.eks. H5N1) (Alexander, 2000a).

Udbrud af HPAI i fjerkræ kendes tilbage til 1959, hvor det første udbrud med HPAI H5N1 blev påvist i høns i Skotland. Frem til omkring 2003 var der ca. 20 udbrud i tamfjerkræ med HPAI H5 eller H7 virus på verdensplan. Frekvensen af udbrud har siden været stigende. De fleste udbrud har været i høns og har typisk involveret fra tusindvis til millioner af dyr (Alexander, 2007). I 2003 ændrede situationen sig imidlertid dramatisk, idet HPAI H5N1 af asiatisk oprindelse blev enzootisk forekommende i dele af Asien og bredte sig til Europa og Afrika, hvor virus har været årsag til udbrud i vilde fugle og/eller fjerkræ i over 60 lande, heraf 24 europæiske (Cattoli et al. 2009). Udover at være et problem i fjerkræproduktionen, anses HPAI H5N1 virus for at være en betydelig human trussel med mere end 400 fatale tilfælde og en frygt for, at dette virus vil kunne udvikle sig til et virus med pandemisk potentiale (Capua og Alexander, 2007).

I starten af 2014 blev der rapporteret udbrud af et nyt euroasiatisk H5N8 virus i trækfugle og fjerkræ i Kina, Japan og Korea. Dette virus var højpatogent i fjerkræ og er et reassortment med H5 fra clade 2.3.4.4 HPAI. Der har ikke været rapporter om at dette virus har forårsaget sygdom i mennesker eller andre pattedyr. I vinteren 2014/2015 blev dette virus rapporteret fra både vilde fugle og fjerkræ i EU (Tyskland, Holland, UK, Sverige, Italien, Ungarn). Genetiske undersøgelser af virus fra både vilde fugle og fjerkræ peger på en rolle for vilde fugle i spredningen af virus. H5N8 viruset blev også fundet i USA, og reassorterede efterfølgende med amerikansk linje NA gener.

Reassorterede clade 2.3.4.4 H5 HPAI virus med andre N typer end N8 (H5N5, H5N6) er ligeledes fundet i Asien. Der er rapporteret om enkelte fatale humane tilfælde med H5N6 HPAI virus i Kina (www.who.int/influenza/human_animal_interface/). Dette virus har også pandemisk potentiale.

I 2016 blev der igen rapporteret om HPAI H5N8 virus i Europa. Det første fund var 27. oktober 2016 i en vild fugl i Ungarn. En uge senere blev der rapporteret om det første udbrud i fjerkræ i Ungarn. Virusset spredte sig herefter hurtigt til de fleste europæiske lande, herunder Danmark 7. november 2016. I første omgang blev udbrud især set i forbindelse med massedødsfald blandt troldænder. Senere var der også mange fund i måger og rovfugle. Udbruddet fortsatte ind i 2017 (og er i skrivende stund ikke afblæst), og omfattede pr. 22. marts 2017 i alt 2609 udbrud i fjerkræ, vilde fugle og fugle i fangenskab, i 29 europæiske lande (Situation report by EURL for Avian Influenza, APHA-Weybridge, 22/03/17). Hertil kom også udbrud i lande udenfor Europa, fx Indien og i Afrika. Genetiske analyser af HA genet indikerer at udbruddene er forårsaget af nært beslægtede virus, som danner et distinkt fylogenetisk cluster, og at de er forskellige fra H5N8 virus fra 2014/2015-udbruddene i EU. Det er sandsynligt, at virus er introduceret med vilde fugle fra Rusland via hhv. en nord- og en centraleuropæisk pathway. Virus er tæt beslægtet med virus, der blev påvist tidligere på året i Tyva, Rusland. FAO (The Food and Agriculture Organization) advarede i september 2016 om, at der var stor risiko for spredning af HPAI H5N8 vest og syd for Tyva med trækfugle, på baggrund af dette fund og ved sammenligning med dynamikken af tidligere introduktioner af HPAI virus til Europa (Sims et al. 2016).

Udover H5N8, er der i mindre omfang påvist HPAI reassortments H5N5 og H5N6 i Europa. Disse virus er sandsynligvis opstået ved reassortment mellem H5N8 HPAI og lokale lavpatogene virus. De er således ikke nært beslægtede med de humanpatogene H5N6 virus fra i Sydøstasien.

Ved udbrud af HPAI i fjerkræ, især i tamænder der opdrættes på friland, vil der være risiko for overførsel til vildfugle populationen (Alexander 2007) og virus kan potentielt spredes over store afstande af vilde fugle, især hvis de ikke eller kun i ringe grad er klinisk syge (Keawcharoen et al. 2008).

LPAI virus kan mutere til HPAI virus. Aminosyre sekvensen omkring HA kløvningssstedet er afgørende for patogeniteten, men konstellationen af de øvrige gener og individuelle genmutationer spiller ligeledes en rolle (Hatta et al. 2001; Stech et al. 2009). De faktorer der medfører transition fra LPAI til HPAI kendes ikke. I nogle tilfælde ser det ud til at virus har muteret fra LPAI til HPAI umiddelbart efter introduktion af LPAI til fjerkræ, mens LPAI virus i andre tilfælde har cirkuleret i månedesvis før den/de nødvendige mutationer er sket (Banks et al. 2001). Det er således rimeligt at antage, at risikoen for, at ændringen fra LPAI til HPAI vil ske, afhænger af hvor længe og hvor mange LPAI virus der cirkulerer i en flok (Alexander, 2007). Dermed er det en uønsket situation at have LPAI H5/H7 virus cirkulerende i fjerkræflokke, og således er det vigtigt at undgå introduktion af LPAI H5/H7 virus. Hvis introduktion sker, er en hurtig diagnose og effektiv bekæmpelse f.eks. ved depopulation af yderste vigtighed. Vilde fugle er i nogle tilfælde identificeret som en mulig kilde til introduktion af virus til fjerkræflokke (Alexander, 2007). Dette kan ske enten ved direkte kontakt eller indirekte kontakt, hvor andre dyrearter, mennesker eller utensilier mekanisk har båret virus ind i flokken. Denne sekundære transmission af virus er i nogle større udbrud af AI, kædet sammen med bevægelse af personale og materiel mellem besætninger. Virus er stabilt i miljøet og kan overleve i længere tid i f.eks. overfladevand, som dermed udgør en kilde til virus og bidrager til cirkulation af virus i bestanden af vilde fugle, især svømmefugle (Alexander, 2007).

LPAI virus kan inddeles i to fylogenetiske hovedlinjer: den eurasiske og den amerikanske linje. Denne opdeling af influenzavirus kan forklares ud fra den geografiske og økologiske adskillelse af fugle der benytter trækruter enten over Europa/Asien/Afrika/Australien eller Amerika (Munster and Fouchier, 2009; Verhagen et al. 2011). Ud over den geografiske opdeling af AI virus ses også en opdeling baseret på værtspopulationer. Et eksempel herpå er H13 og H16 subtyper der primært isoleres fra måger og terner (*Charadriiformes*) (Fouchier et al. 2005). Disse AI virus har udviklet sig til separate genetiske linjer, der er

forskellige fra AI virus af subtyperne H1 – H12 der primært findes i ænder (*Anseriformes*) (Munster et al. 2007).

H9N2 virus er enzootisk forekommende i forskellige typer af terrestrisk fjerkræ flere steder på det euroasiatiske kontinent, nogle gange med øget sygelighed. Dette virus blev første gang påvist i Guangdong provinsen i Kina i 1994. Smitte til mennesker med dødelig udgang er forekommet og virus har doneret interne gener til zoonotiske influenzavirus Asian H7N9 og H10N8.

Virus med subtypen H7N9 kendes fra tidligere, men i marts 2013 blev en særlig H7N9 variant, i det efterfølgende benævnt "Asian H7N9", fundet i Kina. Dette specifikke virus menes at være opstået ved multiple reassortment events af virus fra asiatiske fugle; H7N9 viruset har formodentlig fået sit HA gen fra domesticerede ænder, NA genet fra vilde fugle og de resterende gener fra H9N2 virus fra domesticeret fjerkræ. Viruset er udbredt i fjerkræ i Kina. Viruset er lavpatogent (LPAI) i fjerkræ, men kan forårsage alvorlig sygdom i mennesker. Der har været mere end 1.307 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af infektion, primært i Kina, heraf mindst 489 med dødelig udgang (pr. 16. marts 2017), og der observeres pt. en stigning i antallet af tilfælde og en betydelig geografisk spredning af tilfældene.

For humane cases kan der oftest linkes til forudgående kontakt med inficeret fjerkræ eller miljø, og vedvarende human-human smitte kendes ikke, men virus har pandemisk potentiale (www.who.int). I 2017 er der rapporteret om humane cases med fund af Asian H7N9 virus, som er muteret til at have et HA kløvningssite karakteristisk for HPAI virus (Yang et al. 2017). HPAI udgaven af dette virus er yderst letalt i høns, med et IVPI-index på 2.3 - 3, dvs. alle eksperimentelt inoculerede fugle døde indenfor 24 timer (www.oie.int, OIE Situation Report for Avian Influenza update 10. april 2017). Yderligere oplysninger er påkrævede for at kunne vurdere konsekvenserne af disse fund, men de genetiske analyser indikerer at HPAI H7N9 ikke er mere patogen for mennesker end LPAI H7N9.

I perioden 2003 – 2016 (inkl.) er mere end 850 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af smitte med asian lineage HPAI H5N1 virus fra 16 lande indrapporteret til WHO, heraf 452 med dødelig udgang (who.int). De fleste tilfælde er fra Asien, især Indonesien og Vietnam, og Egypten. I 2016 er kun indrapporteret 10 tilfælde, heraf 3 med dødelig udgang; alle fra Egypten. Alle humane cases kan relateres til kontakt med smittede levende eller døde fugle eller inficeret miljø.

2016 har på europæisk plan især været præget af udbrud med HPAI H5N8 i vilde fugle og fjerkræ i en lang række lande, og udveksling af virus mellem disse segmenter. Dette gælder også Danmark. Derudover havde vi fund af LPAI H7 og LPAI H5 i to gråandeflokke på hhv. Fyn (juli 2016) og i Nordjylland (august 2016), men der blev ikke observeret sekundære udbrud i den forbindelse. LPAI H5/H7 i fjerkræ er et sjældent fund i Danmark. Det seneste forrige udbrud var med LPAI H7N7 i 2013 i en gråandeflok ved Viborg. Alle disse tilfælde blev opdaget i forbindelse med virologisk screening af rutine overvågningsprøver i fjervildtopdræt.

Formål

Formålet med AI overvågningen i vilde fugle i Danmark er at sikre en tidlig påvisning af HPAI (passiv overvågning) og at belyse vilde fugles rolle i spredningen af AI virus (aktiv overvågning). Overvågningen udføres som en virologisk screening, der primært er rettet mod AI virus med subtyperne H5 og H7. Fund af andre virus i vilde fugle subtypes så vidt muligt. Via den molekylære karakterisering af de virus, der påvises i vilde fugle i den danske fauna, og fjerkræ der opdrættes på dansk grund, opnås en mere præcis karakterisering af virus end blot på subtype niveau, fx til hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af Asian H7N9 like virus. De molekylære analyser frembringer ligeledes værdifulde data til en løbende evaluering af egnetheden af de molekylærdiagnostiske assays, der anvendes til at undersøge mistanker om AI i fjerkræ. Dette er en stadig nødvendighed, da AI virus konstant muterer.

AI overvågningen i vilde fugle i Danmark i 2016 bestod af:

1) Passiv overvågning.

Overvågning for HPAI i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens afgørelse af 25. juni 2010 (2010/367/EU), bilag II. Målgruppen af fugle er angivet i artslisten (http://eur-lex.europa.eu/Result.do?T1=V4&T2=2010&T3=367&RechType=RECH_naturel&Submit=S%C3%B8g)

FVST indberettede laboratorieresultaterne fra den passive overvågning til EU kommissionen.

2) Aktiv overvågning.

En national aktiv overvågning for LPAI virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.

3) Molekylær karakterisering.

Udvalgte virus og gener fra 1) + 2) samt fjerkræbesætninger i forbindelse med AI mistanker og virologisk overvågning af opdrættet fjervildt blev karakteriseret molekylært med fokus på karakterisering af H5 og H7 virus.

Materialer og metoder

Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle

Kadavere af fugle fundet døde i naturen blev indsendt til DTU-VET, hvor der blev udtaget kloaksvabere og/eller trachealsvabere i AI kloak(flerstyrke)medie hhv. enkeltstyrkemedie til analyse for AI virus. Svaberne blev testet enkeltvist eller som pools af kloak- og svælgsvaber fra den samme fugl udtaget i kloakmedie. I enkelte tilfælde ved fund af mange døde vilde fugle af samme art og på samme tid og sted, blev svabere fra 5 fugle testet i en pool. Laboratoriesvar blev sendt til indsender med kopi til FVST, Dyresundhed. Fuglene og de tilhørende laboratorieresultater blev ligeledes løbende registreret i FVST's offentligt tilgængelige fugleinfluenza database (<http://fvst.gis34.dk/>).

Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle

Til den aktive overvågning af raske vilde fugle blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra vilde fugle, som i det efterfølgende er opdelt i to kategorier baseret på indsamlingsmetoden:

1) Nedlagt fjervildt. FVST varetog udtagelse af prøver fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt, i alt 377 fugle. Prøverne blev udtaget i perioden 12. september - 7. december 2016, og indsendt på køl til DTU Veterinærinstituttet med FVST's kurerservice.

2) Levende fugle. SNM koordinerede udtagelse af prøver fra vildtlevende fugle, der enten blev fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning eller nedlagt ved jagt samme dag, som prøverne blev taget. Prøverne blev udtaget som kloaksvabere i kloak(flerstyrke)medie og indleveret eller indsendt med Post Danmark til DTU-VET på køl. Der blev indsendt prøver fra 544 fugle, indsamlet 12. februar og i perioden 1. september - 14. december 2016.

Prøver fra op til 5 fugle af samme art og udtaget på samme tid og sted, blev poolet på laboratoriet før test. Alle pools blev undersøgt på DTU-VET med laboratoriemetoder udført i henhold til den diagnostiske manual for aviær influenza, EU direktiv 2005/94/EF, med mindre andet er angivet.

PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse

Alle pools blev indledningsvist screenet for tilstedeværelsen af Influenza A virus med real-time RT-PCR målrettet matrix-genet. Influenza A virus positive pools blev subtypet med specifik RT-PCR (real-time og/eller konventionel RT-PCR) mod H5 og H7 subtyperne. H5 og H7 positive pools blev ligeledes konfirmeret ved sekventering henover HA-kløvningsstedet, og sekvensen blev anvendt til bestemmelse af patogeniciteten som hhv. lavpatogen AI virus (LPAI) og højpatogen AI virus (HPAI)

Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse

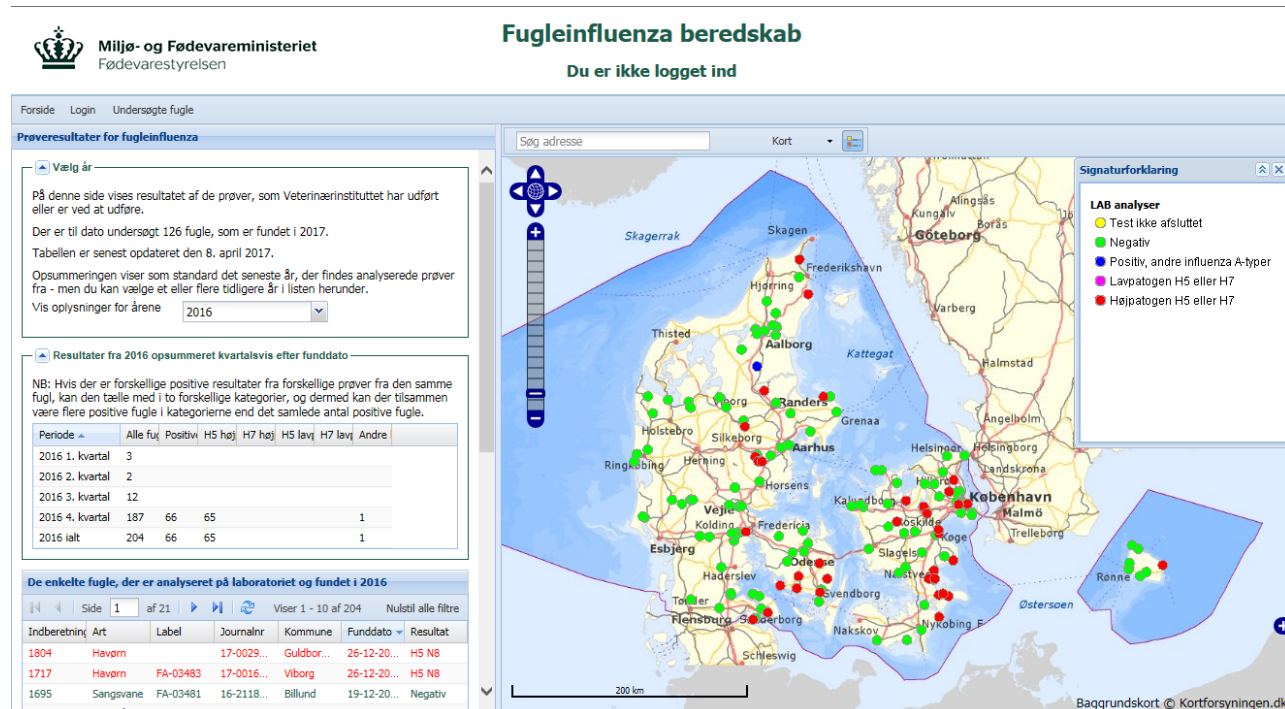
Alle pools, der var PCR positive for AI virus, blev podet i embryonerede hønseæg med det formål at isolere virus. AI virusisolater blev påvist ved pan-AI RT-PCR, og H og N subtypet ved anvendelse af hæmagglutinations inhibitionstest (HI-test) og neuraminidase inhibitionstest (N-test), og/eller ved sekventering af HA og NA generne med in-house protokoller med primere modificeret fra Hofmann et al. (2001). I de fleste tilfælde hvor virusisolaterne ikke var AI, blev isolaterne testet med RT-PCR for PMV1 og evt. ved HI-test overfor aviær paramyxovirustype PMV1-9 antisera.

Resultater og diskussion

Passiv overvågning - døde vilde fugle

Som led i den passive overvågning for AI virus, blev der testet 204 fugle, som var fundet døde i naturen (figur 1, bilag 1). Den 7. november blev en død troldand fundet i stadsgraven ved Christiania, København, og indsendt til undersøgelse som faldvildt. Denne fik påvist HPAI H5N8. I perioden indtil da var der undersøgt 18 fugle indsendt som faldvildt (n=17) eller med mistanke om AI (n=1). Alle disse var negative for influenza A virus. Efter fund af H5N8 HPAI i den døde troldand lukkede DTU-VET ned for undersøgelse af fjerfaldvildt. De resterende døde vilde fugle testet i 2016 blev visiteret af FVST. H5N8 HPAI blev påvist i 65 døde vilde fugle (1 duehøg, 1 ederfugl, 3 havørne, 1 hættemåge, 8 knopsvaner, 5 musvåger, 1 ravn, 1 sangsvane, 3 stormmåger, 9 svartbags, 4 sølvmåger, 28 troldænder), desuden blev influenza A virus, som ikke var H5 eller H7, påvist i en stormmåge. De øvrige 138 prøver var negative for AI virus.

Den geografiske fordeling af fugle indsendt i 2016 fremgår af figur 1. Fuglene er stort set fra hele landet med undtagelse af Nordvestjylland. De 65 positive H5N8 HPAI fugle er fordelt i det østlige Jylland fra Frederikshavn i nord til Sønderborg i syd (n=12), samt på Fyn (n=7), det østlige Sjælland (n=25), på Møn/Nyord (n=19) og én på hhv. Falster og Bornholm. Ingen af de døde og testede fuglene som blev fundet i eller ved de traditionelle store områder for rastende vand-/andefugle i det vestlige Jylland, Limfjorden og det sydvestlige Sjælland blev fundet positive. Ved det sydfynske øhav og ved Nyord/Møn, som også er hjemsted for rastende vand-/andefugle, blev fundet hhv. 3 og 18 positive H5N8 HPAI vandfugle.



Figur 1. Passiv overvågning af AI, Danmark 2016. Detaljerede oplysninger fremgår af <http://fvst.gis34.dk/> og bilag 1.

Efter det første fund af H5N8 HPAI i en død troldand i en København, fulgte rapporter om massedødsfald blandt troldænder den 8. november i havnebassinerne ved Stege, Vordingborg kommune, og i en gammel grusgrav ved Roskilde, 9. november. Der blev påvist HPAI H5N8 i døde fugle fra begge tilfælde. Dernæst blev virus påvist i 2 troldænder fra Fyn fundet den 10. November og i 2 stormmåger, 1 svartbag og 1 knopsvane fra Lindholm Ø, Vordingborg kommune også fundet 10. november. Virus blev efterfølgende påvist i 2 svartbags fra Als, Sønderborg kommune. I dagene herefter fulgte fund af virus i døde vilde fugle

fra primært Syd- og Østsjælland og Fyn. Første fund i Jylland var i en svartbag fundet død den 17. november i Norddjurs kommune. Positive fund i Jylland var primært i rovfugle og bevægede sig over tid op langs østkysten. Det mest nordlige fund overhovedet i vinteren 2016/2017, var i en duehøg fra Ålbæk, Frederikshavns kommune, som blev fundet død den 12. december. Eneste fund på Bornholm var i en svartbag fundet den 23. november.

Påvisning af HPAI H5N8 i døde vilde fugle fortsatte i 2017, hvor den geografiske udbredelse af positive fund spredte sig yderligere og også inkluderede Vestjylland.

Det har været udbrud af HPAI H5N8 i vilde fugle i mindst 22 europæiske lande og flere steder i Asien, Afrika og mellemøsten. Baseret på sekvensanalyse af HA og NA generne er H5N8 virus påvist i Danmark nært besægtet med virus fra øvrige Europa.

Tabel 1. Oversigt over den passive overvågning af AI i Danmark 2009-2016.

Døde vilde fugle	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Antal fugle	83	56	33	18	10	10	37	204
AI virus PCR positive prøver	1	3	1	2	0	0	1	66
H5/H7 LPAI positive prøver	1	0	0	0	0	0	0	0
H5/H7 HPAI positive prøver*	0	0	0	0	0	0	0	65

*alle HPAI virus var H5N8 HPAI.

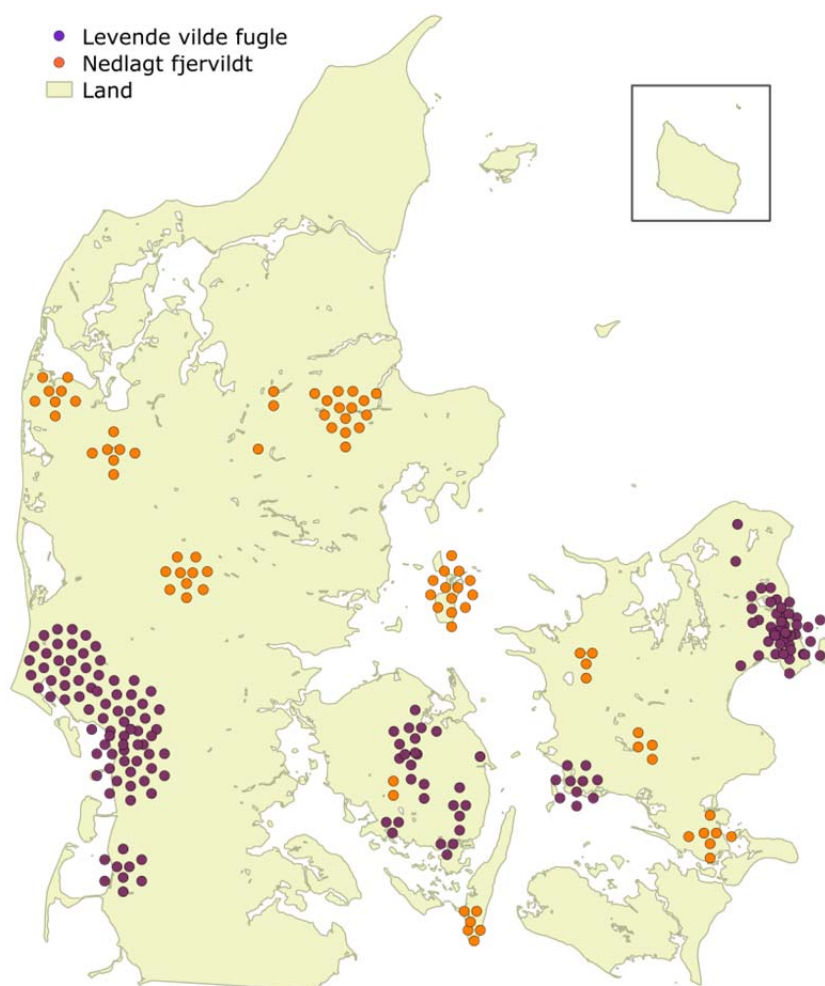
Aktiv overvågning – levende vilde fugle

Prøver

Indsamlingen var målrettet de arter, som bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. Der blev indsamlet prøver fra vilde fugle indleveret på vildthåndteringsvirksomheder ("Nedlagt fjervildt") og fra raske vilde fugle i naturen ("Levende fugle").

I kategorien "nedlagt fjervildt" blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra 377 fugle med nedskudssteder geografisk fordelt som vist i figur 2. Fuglene var skudt ved jagt og indleveret på vildthåndteringsvirksomheder, hvor prøverne blev udtaget.

I kategorien "levende fugle" indgik kloaksvaberprøver fra 544 fugle. Ringmærkere fra Ringmærkningscentralen, Statens Naturhistoriske Museum, indsamlede kloaksvabere fra vildtlevende fugle på flere lokaliteter (figur 2). De "levende fugle" blev enten fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning, eller nedlagt ved jagt samme dag som prøverne blev taget.



Figur 2. Indsamlingssteder på postnr.-niveau for fugle i den aktive overvågning for aviær influenza 2016. Både nedskudssteder for fugle i kategorien "nedlagt fjervildt", hvorfra der blev udtaget prøver på vildthåndteringsvirksomheder, og indsamlingslokaliteter for kategorien "levende fugle", der dækker over prøver indsamlet af Statens Naturhistoriske Museum (SNM), er vist på kortet. Hvert punkt repræsenterer én pool, punkterne er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Der blev i alt undersøgt 243 pools af kloaksvabere fra 921 fugle fordelt på 16 arter og de fleste landsdele (tabel 2). 56 % af prøverne blev indsamlet i Jylland og 16 % i Hovedstadsområdet. Dermed blev målet om at få inddraget en stor andel af prøver fra Jylland nået. Andelen af prøver fra Hovedstadsområdet var lidt højere end i 2015, hvor den udgjorde 10 %, idet prøveindsamlingen i slutningen af perioden blev rettet mod ænder i Hovedstadsområdet med henblik på at undersøge eventuelle raske bærere af HPAI H5N8, i den del af landet hvor HPAI H5N8 særligt var forekommende siden starten af november måned.

Tabel 2. Poolede prøver indsamlet af vildtlevende raske fugle i 2016 fordelt på arter og landsdele.

Art	Jylland	Fyn	Sjælland	Hovedstadsområdet	Sum (pools)
Blisgås		3		1	4
Bramgås	22		2		24
Canadagås	1				1
Dobbeltbekkasin	1				1
Grønbenet rørhøne	1	1		1	3
Gråand, levende fugle	18	16	4	24	62
Gråand, nedlagt fjervildt	52	8	15		75
Grågås, levende fugle	2		5		7
Grågås, nedlagt fjervildt	4				4
Hættemåge		4		3	7
Knopsvane		1	1	7	9
Krikand, levende fugle	31	1			32
Krikand, nedlagt	1				1
Måge				2	2
Pibeand	3	1			4
Skovdue			1		1
Skovsneppe	1				1
Spidsand	1				1
Sølvmåge			2	2	4
Sum (pools)	137	35	31	40	243

Indsamlingen af prøver var koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenza er størst i denne periode. I 2016 blev der indsamlet prøver fra 20 fugle i 1. kvartal. De var alle fra Hovedstadsområdet og negative for influenzavirus. Prøver fra de resterende fugle blev indsamlet i perioden 1. september – 14. december og fordelte sig med 223 fugle i 3. kvartal og 678 i 4. kvartal. Der blev testet i alt 921 fugle fordelt i 243 prøver, heraf var 206 pools og 37 enkeltprøver (tabel 3).

Tabel 3. Oversigt over antal fugle i de testede prøver.

Antal fugle pr. pool	Antal pools testet		Antal fugle
	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	
1	37	0	37
2	25	4	58
3	14	1	45
4	20	9	116
5	67	66	665
I alt	163	80	921

PCR resultater

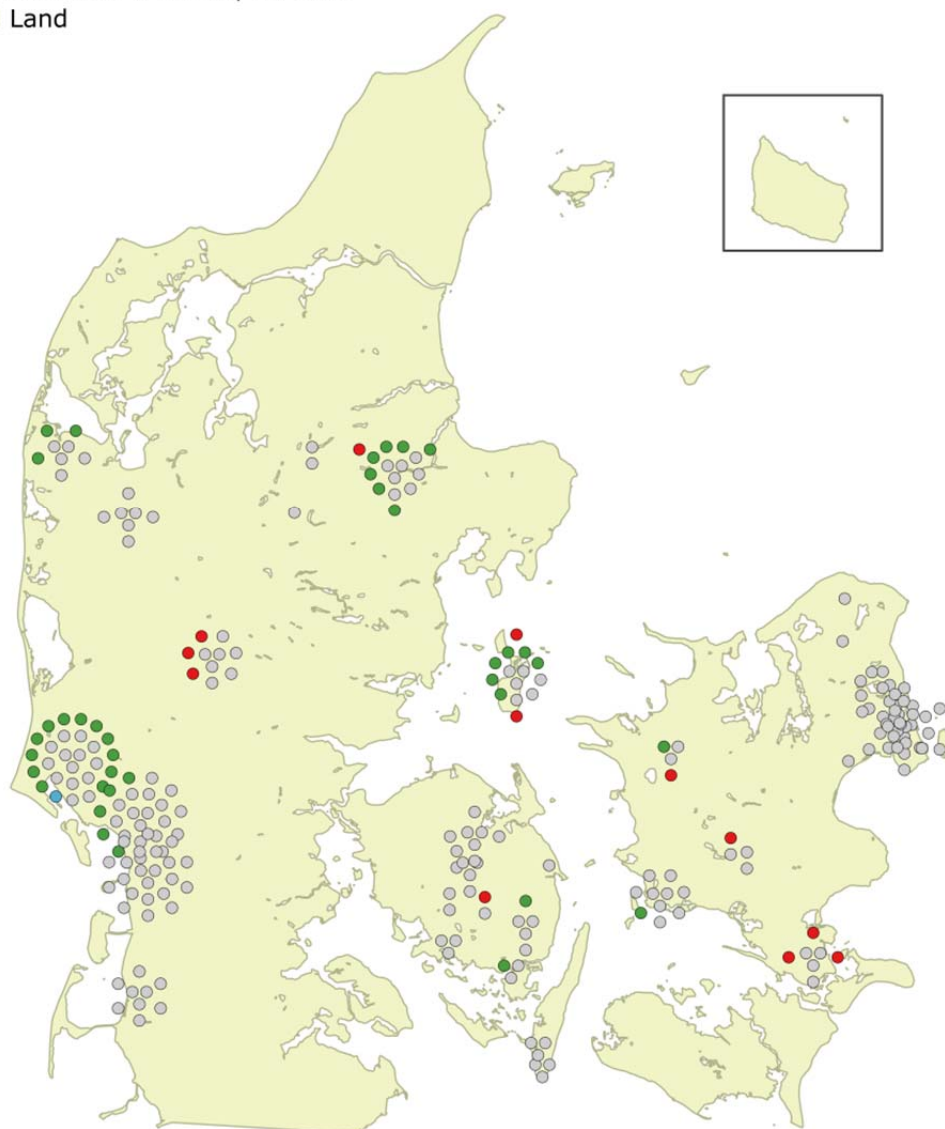
De poolede prøver blev indledningsvist testet med PCR for influenza A virus. I alt var 50 pools positive svarende til 21 % af pools (tabel 4). De positive pools blev testet med specifikke subtypnings PCR metoder, for om de var H5 eller H7 subtyper. Heraf blev 12 pools subtypet og patogenicitetsbestemt ved sekventering til LPAI H5 og én til LPAI H7. Antallet af de positive pools fordelte sig ligeligt på kategorierne "nedlagt fjervildt" og "levende fugle", men frekvensen af positive prøver var dobbelt så høj for nedlagt fjervildt som for levende fugle (tabel 4).

Tabel 4. PCR resultater for de testede prøver/pools fra den aktive overvågning af AI 2016.

H5/H7 resultater er angivet i % af antal positive prøver/pools*, for gråænder er angivet % af hhv. AI PCR pos, H5 og H7 LPAI.

	I alt	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	Gråænder
Antal pools	243	163	80	137 (56 %)
AI PCR positiv	50 (21 %)	22	28	35 (70 %)
H5 LPAI	12 (24 %)*	1	11	12 (100 %)
H7 LPAI	1 (2 %)*	1	0	0 (0 %)

- Influenza A Negativ
- Influenza A Positiv, H5/H7 negativ
- Influenza A Positiv, H5 LPAI
- Influenza A Positiv, H7 LPAI
- Land

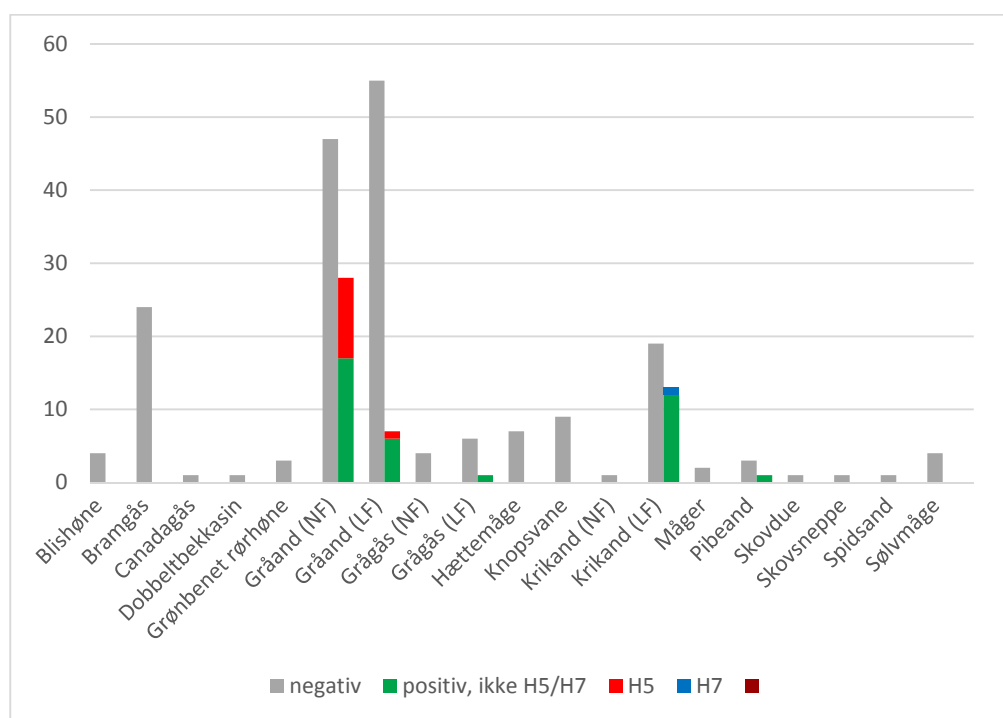


Figur 3. Geografisk fordeling på postnr.-niveau af prøver indsamlet i den aktive overvågning af AI i Danmark 2016. Hvert punkt repræsenterer en pool, som er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og herunder i Hovedstadsregionen. Der blev fundet influenzavirus i pools fra næsten alle indsamlingsområder. Flest positive pools (n=32) var fra Jylland (figur 3).

Der blev udtaget prøver i 1. kvartal og 3.-4. kvartal af 2016. Som nævnt var ingen af prøverne fra 1. kvartal positive for influenzavirus (bilag 2). Derimod var 44 % af pools fra 3. kvartal positive for influenzavirus, mens 16 % af pools fra 4. kvartal var positive.

De 50 pools, der var positive for influenzavirus, var alle fra svømmeænder (gråand, krikand, pibeand), bortset fra en enkelt, der var fra grågås. Gråender stod for størstedelen af de positive pools (n=35), og alle H5 positive pools var fra gråender, mens den H7 positive pool var fra krikænder (figur 4). Resultatet er i overensstemmelse med både europæiske (Munster et al. 2007) og danske overvågningsresultater fra tidligere år (Hjulsager et al. 2012a,b) samt den generelt anerkendte opfattelse af andefugles (primært svømmefugles) rolle som de primære bærere af AI virus (Munster et al. 2007).



Figur 4. Prøvefordelingen udspecificeret på fugleart. Diagrammet angiver antal prøver (pools) fordelt på fugleart og AI PCR-resultatet på primærmateriale inkl. H5/H7 subtypning. NF=nedlagt fjervildt, LF=levende fugle.

Virusisolater

Hæmagglutinerende virus (virusisolater) kunne isoleres efter podning i embryonerede hønseæg fra 21 pools fra vilde fugle i den aktive overvågning, 11 var AI virus og 10 var avian paramyxovirus (PMV) (bilag 3). Der er også isoleret H5N8 HPAI virus fra udvalgte prøver i den passive overvågning, men arbejdet med dette er ikke afsluttet.

Aviær influenza

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra den aktive overvågning i vilde fugle blev der fundet virus med følgende subtyper: H2N3 (n=2), H3N8 (n=3), H4N6 (n=1), H6N2(n=3), H6N? (n=1) og H12N5 (n=1) (Bilag 3). Alle isolaterne var fra svømmeænder, og subtypekombinationerne er før fundet i Danmark (Hjulsager et al. 2012b). Succesraten for isolation af AI virus var på niveau med de foregående år.

Paramyxovirus

Overvågningen var ikke rettet mod påvisning af paramyxovirus (PMV), og der blev derfor ikke foretaget en systematisk screening af alle prøver for PMV. Både AI virus og PMV er imidlertid hæmagglutinerende virus, derfor testes virusisolater, der ikke kan subtypes som AI virus, rutinemæssigt for PMV-1, og i de fleste tilfælde også for de øvrige PMV typer.

Der blev påvist PMV-1 virus i 6 pools, PMV-4 i 2 pools og PMV-6 virus i 2 pools. Disse typer er også blandt de hyppigst påviste i de foregående år. Alle PMV isolaterne var fra gråænder eller krikænder. Det tyder på at svømmeænderne ofte er inficeret med paramyxovirus, og ænder betragtes da også som naturlig vært for de fundne PMV typer (Alexander, 2000b). Da andefugle både betragtes som naturlig vært for AI og PMV virus, er fundet af PMV i AI overvågningsprøverne ikke overraskende.

Prøver indeholdende flere virus

Subtypning af virus afslørede tilstedeværelsen af mere end et AI virus med forskellige subtyper i nogle pools. Fx var der en prøve hvorfra der blev isoleret H6 virus i æg, men påvist H5 LPAI ved PCR og sekventering på primærmaterialet (bilag 3). Den aktive overvågning i vilde fugle er siden 2011 udført på poolerede prøver, hvilket kan være en del af forklaringen på at der kan påvises flere virus i samme prøve. Men det er et naturligt forekommende fænomen, at fugle kan være inficeret med flere forskellige virus på samme tid (fx Dugan et al. 2008). Dette danner basis for dannelsen af virus reassortments, som er en udbredt mekanisme til evolution af AI virus, hvor nye AI virus dannes ved at gener fra forskellige virus blandes, når den samme celle er inficeret med forskellige virus.

Sammenligning med resultater fra tidligere år

Nøgletallene fra den aktive overvågning af AI i 2013-16 er angivet i tabel 5. Det var et krav at prøver der indgik i overvågningen blev modtaget indenfor 5 dage efter udtagelse. Målet på 1000 fugle blev næsten nået, og andelen og antallet af positive pools i 2016 var på niveau med de foregående år. Andelen af H5 positive var på niveau med 2013 og 2015, efter et fald af ukendt årsag i 2014. Det betød, at vi igen kunne udføre en kvalificeret vurdering af H5 diversiteten i danske vilde fugle. Andelen af pools, hvorfra der kunne isoleres virus, var på niveau med tidligere år.

Fuglearten synes at være den afgørende faktor for indsamling af en af AI virus positive pools. Forskelle i indsamlingsstrategierne og deraf følgende håndtering af prøverne undervejs til laboratoriet synes af mindre betydning i denne sammenhæng. De anvendte indsamlingsmetoder har suppleret hinanden, således at overvågningen har indbefattet flere forskellige arter, samtidig med at der blev påvist relativt mange AI virus.

Tabel 5. Sammenligning af AI overvågning 2013-16 i vilde fugle – aktiv overvågning. PCR screenings-resultater på primærmateriale.

	2013		2014		2015		2016	
	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]
Nedlagt fjervildt*	500	103	499	101	494	100	377	80
Levende fugle**	498	160	513	185	479	164	544	163
I alt	998	263	1012	286	973	264	921	243
PCR positive	-	56 (21 %)	-	50 (17 %)	-	72 (27 %)	-	50 (21 %)
H5 LPAI	-	16 (29 %)	-	5 (10 %)	-	20 (28 %)	-	12 (24 %)
H7 LPAI	-	0	-	3 (6 %)	-	1 (1 %)	-	1 (2 %)
H5+H7 LPAI	-	1 (2 %)	-	0	-	0	-	0
AI VI positive	-	14 (25 %)	-	13 (26 %)	-	11 (15 %)	-	11 (22 %)

[#] Prøver er pools af 1-5 kloaksvabere udtaget fra samme art, på samme sted (postnr.) og tid. *Prøver fra nedlagt fjervildt er indsamlet på vildthåndteringsvirksomheder. **Prøver fra Levende fugle er indsamlet via SNM og er enten levende vilde fugle genudsat efter prøveudtagelse eller nedlagt ved jagt og samlet samme dag.

Molekylær karakterisering af AI virus

H5 evaluering af diagnostiske assays

EU referencelaboratoriet vurderede egnetheden af de diagnostiske assays til detektion af HPAI H5N8 virus der cirkulerede i Europa siden oktober 2016, som værende god. I analysen indgik også det første danske virus. HPAI H5N8 indgår ikke i vores egen analyse af assay fitness, som i stedet er målrettet de LPAI H5 virus, der er udbredt i de danske fuglebestande.

Der blev udført fuldlængde HA sekventering på 10 pools fra den aktive overvågning i vilde fugle og fra LPAI virus fra udbruddet med LPAI H5N2 i opdrættede gråænder i 2016. Sekvenserne indgik i en assay fitness analyse (bilag 4), hvor de diagnostiske H5 PCR assays blev evalueret. Til subtypning og patogenicitetsbestemmelse af H5 virus anvendes de EU anbefalede specifikke RT-PCR assays (Slomka et al. 2007a; Slomka et al. 2007b; Slomka et al. 2012) rutinemæssigt til AI diagnostik og overvågning på DTU-VET. Primer- og probesekvenserne for de tre H5 specifikke RT-PCR assays blev sammenlignet med de 11 LPAI H5 virussekvenser fra 2016, samt tilgængelige sekvenser fra 2012-2016. Sekvenserne fra 2012 er tidligere identificeret som særligt problematiske i forhold til detektion med det ene H5 real-time assay pga multiple mutationer, der var tilstede i flere H5 virus, som gav mis-match til primer/probe (Hjulsager 2013).

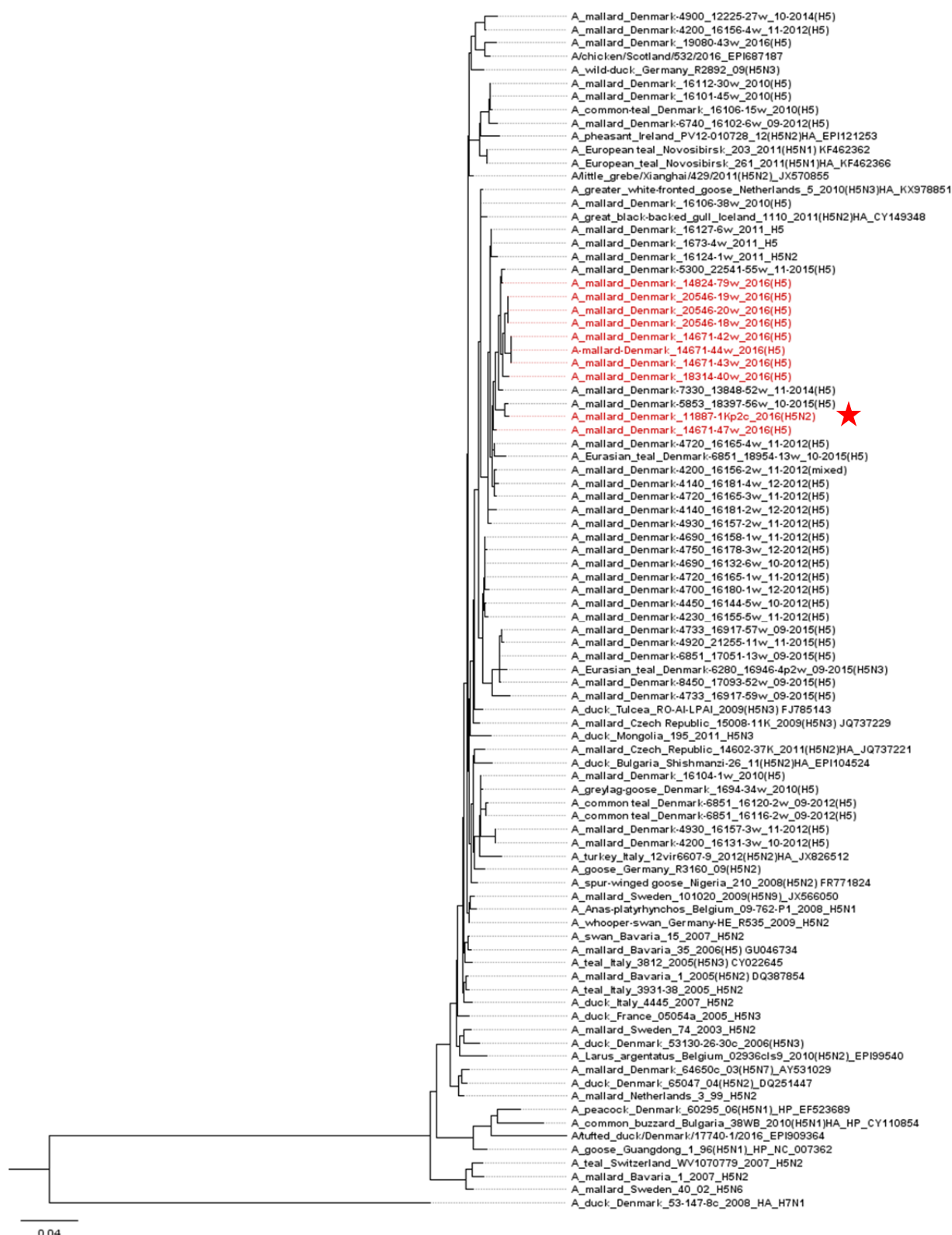
Analysen indikererede, at de assays, der anvendes til subtypning af H5, er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som blev afsløret af de fylogenetiske analyser (se nedenfor). Da de danske virus jo i første omgang er fanget af disse assay, er der naturligvis en bias i resultatet. Der er dog ikke fundet yderligere H5 virus ved subtypning af isolater og primærprøver, der ikke i første omgang var subtypet som H5, med H5 specifikke assays. Det er også vigtigt at supplere med bevågenhed overfor fremkomst af nye virus i omkringliggende lande og resten af verden, særligt Euroasien, som de danske virusgener oftest udveksles med. Det kan være umuligt at designe et enkelt assay bestående af to primere og en probe, som sensitivt kan detektere alle varianter af H5. Det er derfor relevant at anvende flere assays i rutinediagnostikken for at opnå en bedre sensitivitet, ligesom det gøres i dag på DTU-VET. Analysen understreger endvidere vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov. Især det ene H5 assay ("H5" i bilag 4) viste sig uegnet til detektion af flere af de danske H5 virus, der blev fundet i den aktive overvågning. Fire ud af 10 pools ville ikke være blevet subtypet korrekt ved anvendelse af dette assay alene. De har Ct værdien 0, hvilket betyder at prøven er negativ med dette assay. Flere andre pools gav meget høje Ct-værdier, på trods af at det generelle pan-influenza A virus assay detekterede disse med væsentligt lavere Ct-værdi. Dette skyldes de mange mis-match mellem prøve og primer/probe i "H5"-assayet.

H5 LPAI diversitet

Der blev udført fylogenetisk analyse af HA sekvenserne fra 10 LPAI H5 positive pools fra den aktive overvågning og af sekvensen fra det danske udbrud med LPAI H5N2 i opdrættede gråænder 2016. Sekvenserne blev sammenlignet med danske og udenlandske sekvenser fra tidligere år (figur 5).

Den fylogenetiske analyse viser, at H5 generne fra prøverne fra 2016 er nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark i 2014-2015 (figur 5). De er ikke beslægtet med H5N8 HPAI fundet i Europa i 2014. Analysen afslører en betydelig genetisk drift. Ved at sammenholde gruppering i det fylogenetiske træ med prøveudtagelses tid og sted (postnr. og udtagelsesmåned fremgår af virusnavnene i træet for 2012-2015) ses det at der alene er sammenhæng mellem gruppering og udtagelsesår. Ved karakterisering af 19 virus fra 2012 (Hjulsager et al. 2013) var konklusionen den samme.

Analyserne er i overensstemmelse med den udbredte antagelse, at der cirkulerer forskellige grupper af virus blandt vilde fugle, og at der sker udveksling af gener mellem virus.



Figur 5. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde LPAI H5 gener fra vilde fugle og fjerkræ. Sekvenser fra H5 virus fra Danmark 2016 er med rød tekst. Træet er baseret på 800 bp fragment fra HA-genet. HP angiver højpatogen AI. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ. ★ = LPAI H5N2 fra udbrud af AI i farmede gråænder 2016.

H5 HPAI diversitet

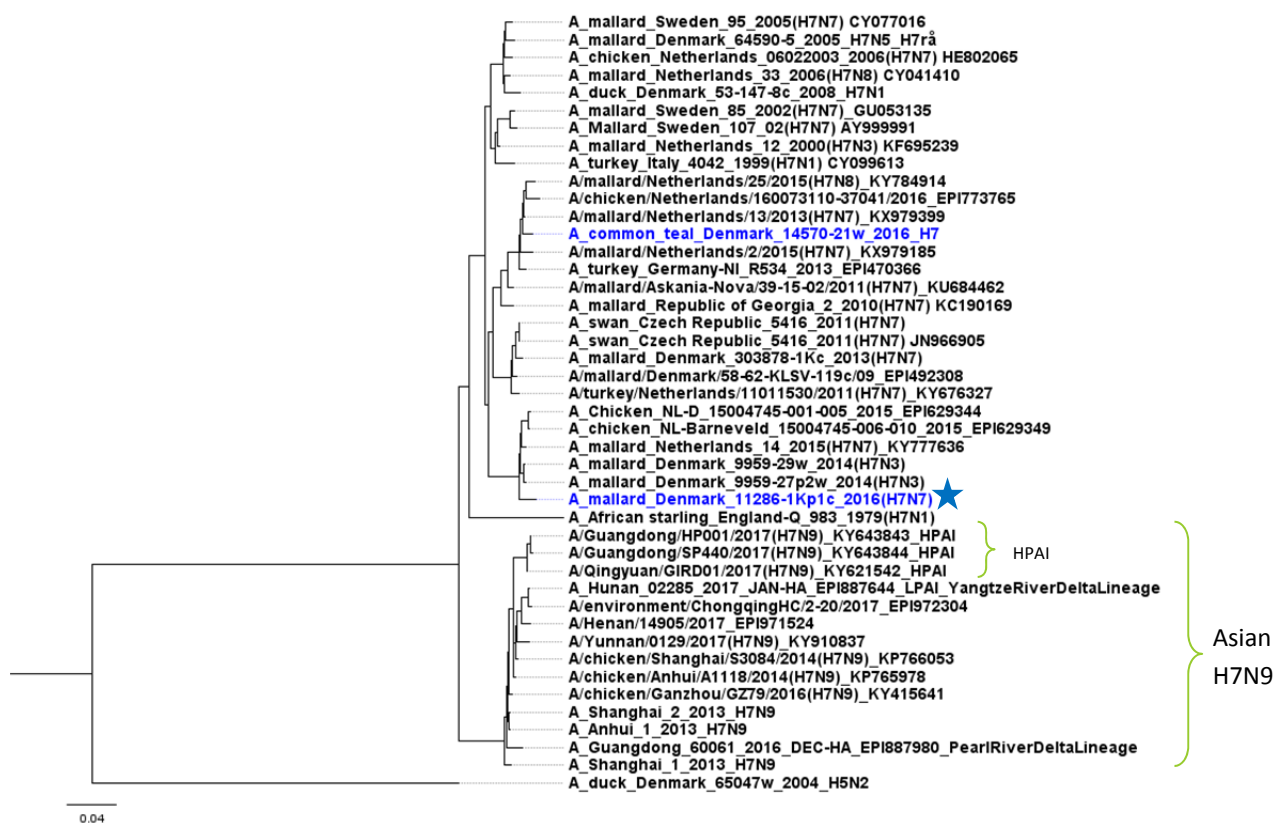
Der er udført fuldlængde sekventering af HA genet i udvalgte virus fra vilde fugle med HPAI H5N8. Molekylærfylogenetisk analyse (figur 6) viste, at disse virus var nært beslægtede med samtidige HPAI H5 virus fra andre europæiske lande. Virus adskilte sig imidlertid genetisk fra HPAI H5N8 fra vinteren 2014/2015, hvor der var enkelte fund af HPAI i fjerkræ og/eller døde vilde fugle i England, Tyskland, Holland, Italien, Ungarn og Sverige. Virus adskilte sig ydermere fra H5N6 der har smittet mennesker i Asien, og fra virus i det foregående udbrud af HPAI i Danmark, hvor HPAI virus med subtype H5N1 var årsag til udbrud i 2006. Yderligere analyser af H5N8 HPAI virus pågår.



Figur 6. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde HPAI H5 gensekvenser fra vilde fugle. Sekvenser af H5 HPAI virus fra Danmark 2016/2017 er fremhævet med rød tekst. Træet er baseret på 1632 bp fragment fra HA-genet. ★ = første danske fund i troldand fra Christiania, København.

H7 diversitet

Der blev fundet LPAI H7 i én pool af prøver fra 5 krikænder i den aktive overvågning i vilde fugle i 2016. Prøverne blev indsamlet af SNM i Sønderjylland. Virus blev karakteriseret som LPAI med kløvningssite sekvensen PEIPKGRGLF, som er den sekvens, der oftest findes i H7 LPAI HA kløvningssite. HA genet blev fuldlængde sekventeret og fylogenetisk analyse viste at de danske H7 virus ikke er nært beslægtede med den humanpatogene H7N9 virus variant fra Asien, der smitter fra fugle til mennesker. Danske LPAI H7 virus fundet i vilde fugle og fjerkræ de senere år er imidlertid nært beslægtede med hinanden og med LPAI H7 virus fra øvrige Europa (figur 7).



Figur 7. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H7 gener fra vilde fugle og fjerkræ. Virus fra Danmark 2016 er med blå tekst. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ. Neighbour-Joining træ baseret på 1613 bp sekvenser. ★ = LPAI H7N7 fra udbrud af AI i farmede gråender 2016.

LPAI H7 virus påvises med meget lavere frekvens end H5 LPAI virus i vilde fugle i Danmark. Ikke desto mindre er det netop H7 LPAI virus, der har givet anledning til flest udbrud i fjerkræ de senere år, senest i 2016 og før det i 2013, 2010 og 2008. Der sker tilsyneladende en udveksling af virus mellem vilde fugle og fjerkræ, i det de virus, der bliver fundet i fjerkræ, er nært beslægtede med virus fra vilde fugle i Danmark. Fylogenetisk analyse af tilgængelige danske H7 virus HA sekvenser indikerer et tæt slægtskab mellem virus i vilde fugle og virus fra udbrud i fjerkræ, i overensstemmelse med teorien om at virus introduceres til fjerkræ via vilde fugle.

H9 virus

Der er en stigende bevågenhed overfor AI virus med H9 subtypen, da denne subtype har opnået enzootisk udbredelse i flere dele af verden, herunder Kina og Mellemøsten, og også optræder i Europa. Der er ligeledes rapporter om, at H9N2 virus kan være mere patogene i fjerkræ end andre LPAI, og så har de også vist zoonotisk potentiale både ved smitte af H9N2 virus til mennesker, men især fordi H9N2 virus også menes at have doneret en del af generne til den humanpatogene LPAI Asian H7N9 virus, samt til HPAI H5N8.

Alle AI virusisolater fra overvågningen i vilde fugle 2016 er subtypet ved sekventering af HA og NA generne. Ingen AI virus isolater var H9 subtype (bilag 3). Baseret på HA sekvenserne, er de danske H9N2 virus, der tidligere er påvist, nærmest beslægtede med dem, der er fundet i vilde fugle i Skandinavien og landene omkring os. De er ikke tæt beslægtet med enzootisk forekommende H9N2 fra Asien.

AI virus i fjerkræ

Der har været fund af LPAI virus med både H5N2 og H7N7 subtype virus i danske fjerkræbesætninger i 2016, begge tilfælde var i opdræt af gråender på hhv. Fyn (juli 2016) og i Nordjylland (august 2016). Der blev ikke observeret sekundære udbrud i den forbindelse. I begge tilfælde viste molekylærphylogenetisk analyse at virus var beslægtede med dem der findes i vilde fugle og fjerkræ fra Europa herunder Danmark.

LPAI H5/H7 i fjerkræ er et relativt sjældent fund under danske forhold. Det seneste forrige udbrud var med LPAI H7N7 i 2013 i en gråandeflok ved Viborg. Yderligere to indsendelser fra gråandepodræt var positive for Influenza A virus i 2016, men virus var ikke H5/H7 subtype. Den ene kunne subtypes til H11N9, mens den sidste ikke kunne subtypes. Alle disse tilfælde blev opdaget i forbindelse med virologisk screening af rutine overvågningsprøver i fjervildtopdræt. Der var ingen kliniske tegn i flokkene, og virus blev påvist i forbindelse med den rutinemæssige overvågning af opdrættet fjervildt, hvor der i 2016 blev undersøgt 260 indsendelser (tabel 8); 215 af fasaner, 32 af gråender, 13 af agerhøns. Hver indsendelse blev undersøgt for AI virus med PCR på en pool af kloaksvabere og på en pool af trachealsvabere fra 10 kadavere indsendt til DTU-VET. Formålet var at påvise LPAI H5/H7 virus, for at undgå udslip til den vilde fauna og for at undgå at disse skal udvikle sig til HPAI.

Der har været 10 serologiske AI mistanker/laboratoriemistanker, hvor der er påvist H5 og/eller H7 antistoffer i rutineovervågningsprøver med HI-test ved reaktion med referenceantigener. Fem indsendelser var fra høns og 5 var fra gråender. Disse blev undersøgt for tilstedeværelsen af cirkulerende AI virus ved virologisk undersøgelse med PCR på svaberprøver udtaget umiddelbart efter antistofpåvisningen. Influenza A virus kunne påvises i 3 tilfælde, alle gråandeflokke. I den ene kunne virus subtypes til H10N4, mens de øvrige to ikke kunne subtypes yderligere end at de ikke var H5 eller H7 subtype. Det er i øvrigt værd at bemærke at den besætning (besætning A, tabel 7) som fik påvist H5/H7 antistoffer i forældredyrene, senere på året fik påvist Influenza A virus, ikke H5/H7 subtype i det opdrættede fjervildtafkom. Det er uvist om dette virus også var H10N4.

Til sammenligning var der i 2015 kun to serologiske mistanker. En fra høns og en fra gråender. Begge fik påvist AI antistoffer på baggrund af reaktion overfor H7 antigen i HI-test. Der kunne ikke påvises Influenza A virus i opfølgende svaberprøver.

Pr. 1. januar 2016 ændrede DTU-VET test-strategien til påvisning af AI H5/H7 antistoffer, idet prøverne nu indledningsvist screenes med ELISA, som detekterer antistoffer af alle subtyper. ELISA antistofpositive prøver testes efterfølgende med HI-test, og kun positiv reaktion i HI-test vil give anledning til mistanke om H5 og/eller H7 AI virus infektion. Før 2016 blev prøverne kun testet med HI-test. Indførelse af ELISA screeningen vil derfor ikke være årsag til hverken færre eller flere påvisninger af H5/H7 antistoffer.

Årsagen til at introducere screening med ELISA var at denne metode har vist sig at være mere sensitiv (Arnold et al. 2017), desuden er den nemmere og billigere at udføre end HI-test, med deraffølgende prisnedsættelse for overvågningsprøverne.

En anden ændring, på foranledning af EU, var indførelse af test overfor et ekstra H5 antigen, H5N8, som kan reagere med antistoffer udløst af infektion med H5N8 HPAI virus, der var årsag til udbrud i fjerkræbesætninger og vilde fugle i enkelte Europæiske lande i 2014-15. Dette virus havde vist sig at være så forskelligt fra øvrige cirkulerende H5 virus, at et enkelt antigen ikke ville reagere tilstrækkeligt sensitivt med alle varianter af H5. Der eksisterede i 2016 ikke et sekundært antigen til H5N8-antigenet til at bekræfte reaktioner med H5N8, derfor kunne forventes lidt flere positive reaktioner på den baggrund. H5N8-antigenet anvendes kun til ænder og gæs, da disse ikke kan forventes altid at udvise tydelige kliniske tegn på infektion med H5N8 HPAI virusset. Virusset er imidlertid ekstremt patogent for fjerkræ der tilhører galliformes ordenen, derfor er det ikke indiceret at teste disse med H5N8-antigenet.

Af de 10 serologiske mistanker, var 5 i gråandeflokke, alle med forskellige CHR-numre, og mistanke om AI opstod alene på baggrund af reaktion overfor H5N8 i 3 af disse. De resterende 2 havde reaktion overfor de

sædvanlige antigener, som blev bekræftet med sekundære antigener. Ud af de 5 serologiske mistanker i høns var 3 indsendelser fra den samme flok, men fra forskelligt tidspunkt, hhv. april, juli og oktober. Det er således ikke uafhængige cases, men kan hidrøre fra persisterende antistoffer. Stigningen i antallet af serologiske mistanker kan kun delvist forklares ved implementering af H5N8 antigen og gentagne indsendelser fra samme flok. Andre årsager af mere spekulativ karakter kan være en øget eksponering af flokkene i overvågningen for H5/H7 virus eller evt. en ændring af cirkulerende virus, fx i vilde fugle, til varianter der kan krydsreagere med H5/H7 antigenerne. En anden forklaring kan være et øget antal af besætninger med adgang til udearealer (økologiske og fritgående høns).

På EU-plan har der ifølge foreløbige resultater (A. Brouwer, APHA, personal communication) været en stigning i antallet af H5 seropositive flokke, og kun i få tilfælde er der påvist H5 virus i opfølgende prøver. Stigningen skyldes primært seropositive fund i Frankrig, som for tiden er hårdt ramt af multiple udbrud af både LPAI og HPAI H5 virus, men ikke udelukkende.

Der er påvist AI virus i en klinisk mistanke i ænder fra et hobbyhold. Virus var HPAI H5N8, og beslægtet med samtidige fund af HPAI i vilde fugle.

Tabel 7. AI virus positive indsendelser fra fjerkræbesætninger i 2016.

Besætnings-ID	Indsendelse	Udtagelsesdato for svaberprøver	Fugleart	Indsendelsesårsag	virus	AI positiv prøve
A	16-12372	11-08-2016*	Gråand	Fjervildt	Ikke H5/H7	K+S
B	16-11887	02-08-2016	Gråand	Fjervildt	H5N2 LPAI	K+S
C	16-9029	13-06-2016	Gråand	Fjervildt	H11N9	K
D	16-11286	21-07-2016	Gråand	Fjervildt	H7N7 LPAI	K
E	16-5280	23-03-2016	Gråand	Antistofpåvisning	Ikke H5/H7	K
A	16-3852	04-03-2016	Gråand	Antistofpåvisning	H10N4	K+S
F	16-6675	20-04-2016	Gråand	Antistofpåvisning	Ikke H5/H7	K
G Hobby	16-19062	19-11-2016	Ænder	Klinisk mistanke	H5N8 HPAI	K+S

K=kloaksvaber; S=trachealsvaber/svælgsvaber (der er undersøgt både K og S fra hver indsendelse). *udtagelsesdato ikke oplyst, derfor er modtagelsesdato angivet.

Indsendelsesårsag fjervildt er fra den virologiske overvågning i fjerkræ; Antistofpåvisning er i forbindelse med den serologiske AI fjerkræovervågning.

Tabel 8. Oversigt over antal indsendelser til den virologiske overvågning af opdrættet fjervildt i perioden 2006-2016. Modificeret fra Hjulsager et al. 2012b.

Indsendelser	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Antal	ca. 250	395	362	333	307	258	272	267	255	256	260
AI virus positive	7	2	4	7	0	4	0	3	6	2	4
AI H5/H7* positive	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2

*alle er LPAI.

Referencer

- Alexander, D.J., 2007. An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. *Vaccine* 25, 5637-5644.
- Alexander, D.J., 2000a. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J., 2000b. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 19 (2), 443-462.
- Arnold, M., Slomka, M., Breed, A., Hjulsager, C., Prits-Verschuren, S., Venema-Kemper, S., Bouwstra, R., Trebbien, R., Zohari, S., Ceeraz, V., Larsen, L., Manvell, R., Koch, G., Brown, I., 2017. Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks. *Epidemiology & Infection*, accepted.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., Alexander, D.J., 2001. Changes in the Haemagglutinin and the Neuraminidase Genes Prior to the Emergence of Highly Pathogenic H7N1 Avian Influenza Viruses in Italy. *Arch. Virol.* 146, 963-973.
- Capua, I., Alexander, D.J., 2007. Animal and Human Health Implications of Avian Influenza Infections. *Biosci. Rep.* 27, 359-372.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Capua, I., 2009. H5N1 Virus Evolution in Europe—An Updated Overview. *Viruses* 2009, 1, 1351-1363. *Viruses* 1, 1351-1363.
- Dugan, V.G., Chen, R., Spiro, D.J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., et al. (2008) The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS Pathog* 4(5): e1000076.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelswaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Fuller, C.M., Collins, M.S., Alexander, D.J., 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.* 154, 929-937.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* 293, 1840-1842.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Handberg, K.J., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Baroch, J.A., DeLiberto, T.J., Larsen, L.E., Jørgensen, P.H., 2012a. Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007-10. *Avian Dis.* 56, 992-998.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., 2012b. Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2003-2011. Rapport, 2.udgave pr. 10, juni 2014.
- Hjulsager, C.K., Krog, J.S., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., 2013. Molekylær karakterisering af influenzavirus fra vilde fugle i Danmark i 2012. Rapport, 31.12.2013..
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all nfluenza A viruses. *Arch. Virology* 146, 2275-2289.

- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., 2008. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 600-607.
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A., Fouchier, R., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathog* 3, 630-638.
- Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2009. Avian Influenza Virus: Of Virus and Bird Ecology. *Vaccine* 27, 6340-6344.
- Sims, L., Khomenko, S., Kamata, A., Belot, G., Bastard, J., Palamara, E., Bruni, M., von Dobschuetz, S., Dauphin, G., Raizman, E., Lubroth, J., 2016. H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) of clade 2.3.4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in the Tyva Republic, the Russian Federation – potential for international spread. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1-8.
- Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J., Löndt, B.Z., Brown, I.H., Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thorén, P., Czifra, G., 2007a. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. *Avian Dis.* 51, 227-234.
- Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I.H., 2007b. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 51, 373-377.
- Slomka, M.J., To, T.L., Tong, H.H., Coward, V.J., Hanna, A., Shell, W., Pavlidis, T., Densham, A.L.E., Kargiolakis, G., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2012. Challenges for accurate and prompt molecular diagnosis of clades of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses emerging in Vietnam. *Avian Pathol.* 41, 177-193.
- Slomka, M.J., Hanna, A., Mahmooda, S., Govil, J., Krill, D., Manvell, R.J., Shell, W., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2013. Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbiol.* 162, 530-542.
- Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schröder, D., Vahlenkamp, T.W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T.C., Stech, J., 2009. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J. Virol.* 83, 5864-5868.
- Verhagen, J.H., Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2011. 28 - Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier, London, pp. 729-749.
- Yang, J.-R., Liu, M.-S., 2017. Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J. Formosan Med. Ass.* 116, 210-212.

Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning

AI 2016 – passiv overvågning

Kategori	Tilstand	Art	VET sagsnr.	Kommune	Indsamlingsdato	Resultat
Faldvildt	Død	Musvåge	16-01414-01	Stevns	27-01-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Musvåge	16-01422-01	Kalundborg	02-02-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-01789-01	Frederikssund	15-02-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Fjeldvåge	16-05064-01	Guldborgsund	10-04-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Rød Glente	16-05063-01	Guldborgsund	10-04-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-01681-01	Vordingborg	04-07-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Grågås	16-11985-01	Sønderborg	22-07-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	16-11948-03	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	16-11948-02	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	16-11948-01	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-11943-03	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-11943-02	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-11943-01	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Gråand	16-11944-01	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-11947-01	København	03-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Sortkrage	16-12366-01	Aalborg	08-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Musvåge	16-12365-01	Køge	09-08-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Knopsvane	16-15786-01	Rødovre	05-10-2016	Negativ
Faldvildt	Død	Troldand	16-17740-01	København	07-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Gråand	16-18338-01	København	08-11-2016	Negativ
FVST	Død	Troldand	16-18337-10	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-09	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-08	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-07	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-06	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-05	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-04	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-03	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-02	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18337-01	Vordingborg	08-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-08	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-07	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-06	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-05	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-04	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-03	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-02	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18429-01	Roskilde	09-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Råge	16-18477-01	Vejen	10-11-2016	Negativ
FVST	Død	Troldand	16-18476-02	Fåborg-Midtfyn	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18476-01	Fåborg-Midtfyn	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Stormmåge	16-18344-02	Vordingborg	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Stormmåge	16-18344-01	Vordingborg	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-18345-02	Vordingborg	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18345-01	Vordingborg	10-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-18800-02	Sønderborg	11-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-18800-01	Sønderborg	11-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18555-01	Faxe	11-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Gråand	16-18554-01	Aarhus	11-11-2016	Negativ
FVST	Død	Mosehornugle	16-17934-01	Tårnby	11-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråand	16-17933-01	Ringsted	11-11-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-18804-01	Gladsaxe	12-11-2016	Negativ
FVST	Død	Troldand	16-18556-01	Faxe	12-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18552-01	Vordingborg	12-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18553-01	Vordingborg	12-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18551-01	Vordingborg	12-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Musvåge	16-18494-01	Tårnby	12-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-18557-01	Odsherred	13-11-2016	Negativ
FVST	Død	Mosehornugle	16-18558-01	Kalundborg	14-11-2016	Negativ

FVST	Død	Troldand	16-18581-01	Ringkøbing-Skjern	14-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortand	16-18583-01	Varde	14-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-18559-01	Varde	14-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-18576-01	Varde	14-11-2016	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	16-18584-01	Holstebro	14-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-18614-01	Billund	15-11-2016	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	16-19078-01	Sønderborg	15-11-2016	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	16-19077-01	Sønderborg	15-11-2016	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	16-19076-01	Sønderborg	15-11-2016	Negativ
FVST	Død	Husskade	16-19124-01	Sønderborg	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19123-01	Sønderborg	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Canadagås	16-19070-01	Dragør	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Husskade	16-19074-01	Egedal	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Skovsneppe	16-19073-01	Kalundborg	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Ederfugl	16-19125-01	Sønderborg	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-19069-01	Stevns	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-19068-01	Lolland	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Alk	16-19075-01	Aarhus	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-18577-01	Roskilde	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-18578-01	Roskilde	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-18579-01	Lejre	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18575-01	Roskilde	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-18560-01	Roskilde	16-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Musvåge	16-19072-01	Sønderborg	16-11-2016	Negativ
FVST	Død	Svartbag	16-18686-01	Norddjurs	17-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Duehøg	16-19118-01	Slagelse	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-19128-01	Odense	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Rødben	16-19127-01	Aabenraa	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-19120-01	Billund	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-19119-01	Billund	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-19121-01	Billund	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	16-19122-01	Tønder	17-11-2016	Negativ
FVST	Død	Svartbag	16-19067-01	Vordingborg	17-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Råge	16-19189-01	Skanderborg	18-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-18685-01	Aarhus	18-11-2016	Negativ
FVST	Død	Husskade	16-19191-01	Lyngby-Taarbæk	18-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvit	16-19129-01	Assens	18-11-2016	Negativ
FVST	Død	Grønirisk	16-19131-01	Assens	18-11-2016	Negativ
FVST	Død	Troldand	16-19190-01	Rudersdal	18-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Hættemåge	16-19117-01	Køge	18-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Sortkrage	16-19596-01	Syddjurs	19-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19598-01	Ringkøbing-Skjern	19-11-2016	Negativ
FVST	Død	Skarv	16-19193-01	Norddjurs	19-11-2016	Negativ
FVST	Død	Grågås	16-19195-01	Varde	19-11-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-19192-01	Skanderborg	19-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Husskade	16-19601-01	Guldborgsund	20-11-2016	Negativ
FVST	Død	Troldand	16-19603-01	København	20-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-19595-01	Furesø	20-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Havlit	16-19198-01	Bornholm	20-11-2016	Negativ
FVST	Død	Råge	16-19652-01	Hillerød	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-19604-01	Odense	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Fiskehejre	16-19597-01	Nordfyns	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Duehøg	16-19194-01	Holstebro	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19196-01	Kolding	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19197-01	Vejen	21-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-19329-01	Svendborg	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	16-19600-01	Odsherred	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	16-19649-01	Odsherred	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Blisgås	16-19653-01	Bornholm	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-19328-01	Mariagerfjord	22-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Gråand	16-19330-01	Svendborg	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Ringdue	16-19651-01	Kolding	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-19654-01	Køge	22-11-2016	H5N8 HPAI

FVST	Død	Svartbag	16-19659-01	Bornholm	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Svartbag	16-19647-01	Lemvig	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Svartbag	16-19648-01	Lemvig	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19650-01	Aabenraa	22-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-19646-01	Faaborg-Midtfyn	22-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Troldand	16-19602-01	København	23-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Havørn	16-19408-01	Vordingborg	23-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Skarv	16-19339-01	Norddjurs	23-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19334-01	Svendborg	23-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Svartbag	16-19333-01	Bornholm	23-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Hættemåge	16-19331-01	Struer	23-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråand	16-19332-01	Assens	23-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	16-19407-01	Holbæk	24-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-19335-01	Mariagerfjord	24-11-2016	AI ikke H5/H7, LPAI
FVST	Død	Sølvmåge	16-19404-01	Ringkøbing-Sjærn	24-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-19338-01	Lemvig	24-11-2016	Negativ
FVST	Død	Stormmåge	16-19337-01	Viborg	24-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråand	16-19336-01	Aabenraa	24-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19466-01	Kolding	25-11-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-19409-01	Ringkøbing-Sjærn	25-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-19402-01	Faaborg-Midtfyn	25-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Tårnfalk	16-19403-01	Nordfyns	25-11-2016	Negativ
FVST	Død	Skarv	16-19401-01	Guldborgsund	25-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-19400-01	Næstved	25-11-2016	Negativ
FVST	Død	Svartbag	16-19406-01	Fredericia	25-11-2016	H5 HPAI
FVST	Død	Gråkrage	16-19487-01	Frederikshavn	26-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråkrage	16-19486-01	Frederikshavn	26-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-19412-01	Svendborg	26-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Solsort	16-19470-01	Aalborg	26-11-2016	Negativ
FVST	Død	Husskade	16-19471-01	Aalborg	26-11-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-19465-01	Sorø	27-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Spurvehøg	16-19469-01	Næstved	27-11-2016	Negativ
FVST	Død	Råge	16-19468-01	Frederiksund	28-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19472-01	Frederikshavn	28-11-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Knopsvane	16-19474-01	Bornholm	29-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sortkrage	16-19467-01	Sorø	29-11-2016	Negativ
FVST	Død	Råge	16-19473-01	Bornholm	29-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråkrage	16-19341-01	Helsingør	30-11-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19485-01	Billund	30-11-2016	Negativ
FVST	Død	Gråand	16-19410-01	Ringsted	30-11-2016	Negativ
FVST	Død	Spurvehøg	16-19655-01	Aalborg	01-12-2016	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	16-20497-01	Vejle	02-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-19656-01	Kolding	02-12-2016	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	16-19658-01	Vejle	02-12-2016	Negativ
FVST	Død	Ravn	16-19657-01	Nyborg	02-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Canadagås	16-20501-01	Brønderslev	03-12-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-20442-01	Holbæk	03-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Hættemåge	16-20441-01	Faxe	03-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-20499-01	Aalborg	04-12-2016	Negativ
FVST	Død	Gråkrage	16-20439-01	Randers	04-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-20500-01	Brønderslev	04-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-20496-01	Kolding	04-12-2016	Negativ
FVST	Død	Skarv	16-20502-01	Vejle	05-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-20498-01	Aalborg	05-12-2016	Negativ
FVST	Død	And	16-20440-01	Viborg	05-12-2016	Negativ
FVST	Død	Hættemåge	16-20504-01	Haderslev	06-12-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-20503-01	Hedensted	06-12-2016	Negativ
FVST	Død	Natugle	16-20181-01	Varde	07-12-2016	Negativ
FVST	Død	Vibe	16-20231-01	Randers	08-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-20182-01	Skanderborg	08-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Sølvmåge	16-20180-01	Skanderborg	08-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Sangsvane	16-20233-01	Aalborg	09-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-20232-01	Aalborg	09-12-2016	Negativ
FVST	Død	Gråand	16-20239-01	Vejle	11-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-20240-01	Billund	11-12-2016	Negativ

FVST	Død	Canadagås	16-20237-01	Aalborg	11-12-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-20234-01	Bornholm	12-12-2016	Negativ
FVST	Død	Duehøg	16-20236-01	Frederikshavn	12-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Musvåge	16-20235-01	Aalborg	12-12-2016	Negativ
FVST	Død	Tårnfalk	16-21185-01	Gribskov	14-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21182-01	Varde	15-12-2016	Negativ
FVST	Død	Råge	16-20985-01	Viborg	15-12-2016	Negativ
FVST	Død	Knopsvane	16-21186-01	Skanderborg	16-12-2016	Negativ
FVST	Død	Musvåge	16-21183-01	Horsens	16-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sangsvane	16-21187-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21188-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21189-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21190-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21191-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Sølvmåge	16-21192-01	Billund	19-12-2016	Negativ
FVST	Død	Havørn	17-00292-01	Guldborgsund	26-12-2016	H5N8 HPAI
FVST	Død	Havørn	17-00160-01	Viborg	26-12-2016	H5N8 HPAI

Faldvildt: indsendt af borgere eller Veterinærenhed, der foretages undersøgelser udover AI i regi af Center for Vildtsundhed.

FVST: mistanke om AI indsendt/visiteret af FVST.

Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning

AI 2016 – aktiv overvågning

Kvartal	Lokalitet	Fangst metode	Dyreart	Antal pools	Antal fugle	AI virus positive pools	H5 LPAI positive pools	H7 LPAI positive pools	AI virus isolater
1	KBH	Levende	Blishøne	1	1	0	0	0	
1	KBH	Levende	Grønbenet_rørhøne	1	1	0	0	0	
1	KBH	Levende	Gråand	2	6	0	0	0	
1	KBH	Levende	Hættemåge	3	4	0	0	0	
1	KBH	Levende	Knopsvane	1	2	0	0	0	
1	KBH	Levende	Måger	2	2	0	0	0	
1	KBH	Levende	Sølvmåge	2	4	0	0	0	
3	KBH	Levende	Knopsvane	3	15	0	0	0	
3	Jylland	Nedlagt	Gråand	15	75	8	1	0	2 x H3N8
3	Jylland	Levende	Canadagås	1	1	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Dobbeltbekkasin	1	1	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Gråand	9	31	3	0	0	
3	Jylland	Levende	Grågås	2	2	0	0	0	
3	Jylland	Levende	Krikand	15	58	8	0	1	H6N2
3	Sjælland	Nedlagt	Gråand	16	80	5	4	0	
4	Fyn	Levende	Blishøne	3	5	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Grønbenet_rørhøne	1	2	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Gråand	16	60	2	1	0	H4N6
4	Fyn	Levende	Hættemåge	4	8	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Knopsvane	1	1	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Krikand	1	3	0	0	0	
4	Fyn	Levende	Pibeand	1	1	1	0	0	
4	KBH	Levende	Gråand	22	53	0	0	0	
4	KBH	Levende	Knopsvane	3	6	0	0	0	
4	Jylland	Nedlagt	Gråand	36	161	14	5	0	2 x H2N3, H3N8, H6
4	Jylland	Nedlagt	Grågås	4	20	0	0	0	
4	Jylland	Nedlagt	Krikand	1	2	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Bramgås	22	109	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Grønbenet_rørhøne	1	1	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Gråand	9	31	2	0	0	
4	Jylland	Levende	Krikand	16	65	5	0	0	H6N2, H12N5
4	Jylland	Levende	Pibeand	3	6	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Skovsneppe	1	1	0	0	0	
4	Jylland	Levende	Spidsand	1	1	0	0	0	
4	Sjælland	Nedlagt	Gråand	8	39	1	1	0	
4	Sjælland	Levende	Bramgås	2	10	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Gråand	4	12	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Grågås	5	25	1	0	0	H6N2
4	Sjælland	Levende	Knopsvane	1	2	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Skovdue	1	4	0	0	0	
4	Sjælland	Levende	Sølvmåge	2	10	0	0	0	
Ialt				243	921	50	12	1	11

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx.

Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

H5 og H7 LPAI er påvist ved PCR subtypning og HA kløvningssite sekventering.

AI virusisolater er virus, der er isoleret i æg og subtyperet ved HI-test/N-test og eller sekventering af HA og NA fra virusisolaterne.

Bilag 3. Virusisolatoversigter

LPAI virus isolater fra den aktive AI overvågning, fjervildtopdræt-overvågningen og serologiske mistanker 2016. Subtype af isolater er fundet ved HI- og N- test og/eller sekventering. Subtype på originalmateriale er fundet ved PCR og/eller sekventering.

H-type	subtype	Art	Prøve-id	Subtype på originalmateriale
H2	H2N3	Gråand	16-19080-44 w	Ikke H5/H7
	H2N3	Gråand	16-19080-46 w	Ikke H5/H7
H3	H3N8	Gråand	16-14824-80 w	Ikke H5/H7
	H3N8	Gråand	16-14824-89 w	Ikke H5/H7
	H3N8	Gråand	16-19080-47 w	Ikke H5/H7
H4	H4N6	Gråand	16-19753-36 w	Ikke H5/H7
H5	H5N2 LPAI	Gråand	16-11887-1K c	H5N2 LPAI
H6	H6N2	Krikand	16-15670-12 w	Ikke H5/H7
	H6N2	krikand	16-16473-23 w	Ikke H5/H7
	H6N2	Grågås	16-20723-26 w	Ikke H5/H7
	H6	Gråand	16-20546-18 w	H5 LPAI
H7	H7N7 LPAI	Gråand	16-11286-1K c	H7N7 LPAI
H10	H10N4	Gråand	16-3852-3S c	Ikke H5/H7
H11	H11N9	Gråand	16-9029-1 c	Ikke H5/H7
H12	H12N5	Krikand	16-16376-19 w	Ikke H5/H7

w=vild fugl; c=fjervildtopdræt eller fra serologisk mistanke i fjerkræ.

Virus fra overvågningen i vilde fugle 2016 der er isoleret i æg og som ikke var influenza A virus. Typning af PMV isolater med HI-test, samt AI subtype fundet ved PCR direkte på originalmaterialet.

Virus	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale
PMV-1	gråand	16-14570-19	Ikke H5/H7
PMV-1	Gråand	16-14671-43	H5 LPAI
PMV-1	gråand	16-14671-44	H5 LPAI
PMV-1	Gråand	16-14824-81	Ikke H5/H7
PMV-1	gråand	16-14824-83	Ikke H5/H7
PMV-1	krikand	16-14586-14	Ikke H5/H7
PMV-4	gråand	16-14671-46	Ikke H5/H7
PMV-4	gråand	16-14671-47	H5 LPAI
PMV-6	Krikand	16-14568-12	Ikke H5/H7
PMV-6	krikand	16-14943-11	Ikke H5/H7

Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 PCR assays

Mismatch mellem virussekvens og primere og prober er markeret med rødt. "----" angiver at sekvens ikke findes.

Konventionel H5 KHA			
Ct Al-matrix	Virus/primernavn	KHA-1	KHA-3 rev compl.
	primersekvens	CCTCCAGARTATGCMTAYAAAAATTGTC	CARGGMATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
24,0	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,0	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
24,3	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,3	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,1	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,8	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,9	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGCTGGTA
30,4	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,1	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,4	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)		CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,3	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)		CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,3	A/Eurasian _teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)		CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)		CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)		CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,3	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,9	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,0	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA

H5

Ct AI-matrix	Ct H5	Virus/primernavn	H5LH1	H5PRO	H5RH1 rev compl.
		primersekvens	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG	TCWACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGRTAGCTGGTCT
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	ACATATGACTACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	ACATATGACTACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
24,0	35,9	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	ACATA C GATTACCCG C ATTATACAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,0	33,7	A/common_tal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	ACATA C GATTACCCG C AGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
24,3	25,7	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	ACATA C GATTACCCG C ATTATACAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,3	38,4	A/common_tal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	ACATA C GATTACCCG C AGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,1	32,7	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,8	0,0	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	ACATATGA A TTACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTT C CTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,9	16,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	36,7	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	33,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	33,7	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,1	37,9	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	32,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,5	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	ACATA C GATTACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,1	33,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGG T AAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,3	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34,6	38,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,3	37,8	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,3	37,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,6	0,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,3	21,7	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	ACATATGA T TACCC G CATTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AAATATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,9	0,0	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	ACATATGA T TACT C GAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	ACATATA A TTACCCG C AGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,0	36,6	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,5	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	ACATATGA T TACCCG C AAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT

H5CS

Ct AI-matrix	Ct H5CS	Virus/primernavn	H5CS-240L	H5CS-240ProIno	H5CS-192R rev compl.
		primersekvens	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	IGAATGCCCCAAATAYGTGA	TATTTGGRGCTATAGCAGGC
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,0	25,2	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,0	32,5	A/common_tal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,3	26,1	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,3	33,5	A/common_tal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,1	31,6	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	G AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,8	34,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGA GTGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
14,9	11,1	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	28,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,8	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	30,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,1	29,3	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	29,5	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,1	28,6	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,5	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	37,6	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
34,6	34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
35,3	34,2	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,3	34,6	A/Eurasian_tal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,6	36,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
14,3	12,4	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC C CCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC C CCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC C CCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	34,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	---CCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,9	34,1	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-CAACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	G ATACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,6	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,0	33,2	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	34,2	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAAC T CC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC

Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2016.



Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2016.

Der er indgået aftale mellem Fødevarestyrelsen (FVST) og DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) om overvågning for aviær influenza i vilde fugle i 2016 til et samlet budget på 650.000 kr., jf. "Aftale nr. 2 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter i 2016 (fugleinfluenza, West Nile Virus, virus i flagermus, resistens, sygdomsdatabase samt overvågningsprogrammer der afregnes efter antal prøver)". I henhold til aftalen afholder FVST udgifterne til udtagning af prøver udenfor projektbudgettet i aftalen.

Projektet gennemføres i samarbejde mellem Fødevarestyrelsen (FVST), Statens Naturhistoriske Museum, KU (SNM) og Veterinærinstituttet DTU (DTU-VET).

Udgifter til obduktion og PCR-test i den passive overvågning af døde eller syge vilde fugle indgår ikke i budgettet for fugleinfluenzaovervågningen, men faktureres løbende til FVST Dyresundhed, jf. tabel 1 i ovennævnte aftale nr. 2 for ramme for antal obduktioner og analyser.

Vildfugleovervågningen i 2016 omfatter:

- 1) En EU koordineret passiv overvågning for højpatogen aviær influenza (HPAI) virus i vilde fugle fundet døde eller syge, i medfør af Kommissionens Afgørelse 2010/367/EU¹.
- 2) En national aktiv overvågning (screening) for lavpatogen aviær influenza (LPAI) virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.
- 3) Molekylær karakterisering af udvalgte virus og gener fra 1) + 2). Der fokuseres på karakterisering af H5 og H7.

Baggrund

FVST er forpligtet til at overvåge for HPAI virus i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens Afgørelse¹ af 25. juni 2010 (2010/367/EU). Overvågningen er en del af det EU-baserede overvågningsprogram for AI, der har været gennemført siden 2003, og som løbende er blevet justeret.

FVST udfører en national aktiv overvågning for LPAI virus i levende/nedlagte vilde fugle. Overvågningen foretages som en screening for LPAI virus i vildt levende fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, herunder undersøgelse af nedlagt vildt (fortrinsvist svømmeænder).

Danmark er i kraft af sin geografiske placering et knudepunkt på efterårstrækket for mange vandfuglearter, der primært yngler nord og nordøst for Danmark. Det er eksempelvis arter som grågås, gråand, krikand, pibeand, troldand, hættemåge, stormmåge m.fl. Enkelte arter kommer dog fra et større område, der strækker sig fra det nordøstlige Canada til Nordsibirien. Det er eksempelvis arter som kortnæbbet gås, knortegås, bramgås og stenvender. De fleste arter overvintrer i Europa og Nordafrika, men især vadefugle trækker længere mod syd. Alene i efterårs- og vintermånederne opholder omkring 3 millioner andefugle sig i de danske farvande. Det samlede antal vandfugle der trækker gennem landet er sandsynligvis langt større.

Hvis syge vandfugle, inficerede med fugleinfluenza, er i stand til at flyve over store afstande, og hvis disse trækfugle kan sprede virus til lokale arter eller omgivelserne, er ophavsområdet til kilde for smitte omfattende.

¹ Kommissionens Afgørelse nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle (2010/367/EU)

I dette projekt er målet at indsamle flest mulige positive fugleinfluenzaprøver. Blandt andet derfor er indsamlingerne koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenza er størst i denne periode. Endvidere er indsamlingen koncentreret om de arter, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. I projektet har der derfor i de senere år været fokuseret på svømmeænder (især gråand, krikand, pibeand), gæs, svaner og måger.

Dette projekt er konstrueret på en sådan måde, at både artssammensætningen og den geografiske fordeling er stærkt afhængig af SNM's korps af frivillige ringmærkere og deres allerede eksisterende ringmærkningsaktiviteter. Det er lykkedes i de foregående år at indsamle prøver fra en lang række forskellige lokaliteter på tværs af landet, fra Vestjylland til Østsjælland. Dermed vil prøverne sandsynligvis repræsentere de mindre geografiske forskelle der måske er mellem fugle der gæster det vestlige Jylland og dem der gæster Østdanmark.

De enkelte arters træk- og spredningsmønstre er beskrevet i værket Dansk Trækfugleatlas (Bonløkke et. al. 2006).

Fremgangsmåde

Alle prøver, der skal indgå i den passive overvågning (1) og den aktive screening (2), indsendes til DTU-VET førstkommande hverdag efter prøveudtagning.

De sidste prøver i den aktive overvågning skal være modtaget på DTU-VET senest 19. december kl. 10. Der kan maksimalt analyseres ca. 20 pools pr. uge, svarende til max. 100 fugle fra den aktive screening.

1) Passiv overvågning

Formålet med overvågningen er dels at undersøge døde og syge vilde fugle for HPAI virus, dels at få indberetninger om usædvanlig dødelighed og markante sygdomsudbrud hos vilde fugle, der kan være tegn på smitte med aviær influenza.

Fuglearter omfattet af overvågningen fremgår af bilag 1 til denne aftale.

Veterinærenhederne står for visitering og indsendelse af døde og syge vilde fugle indberettet af borgere.

FVST har etableret en aftale med Naturstyrelsen (NS) om, at der indsamles og indsendes døde vilde fugle fra vildtreservater i fem udvalgte enheder.

Egnede undersøgte fugle indsendt til DTU-VET som faldvildt, indgår også i overvågningen.

Det kan være vanskeligt at sikre det ønskede antal døde vilde fugle, idet antallet varierer meget med årstid, lokalitet og vejrlig, især om vinteren. Ligeledes er det kendt, at døde vilde fugle i løbet af kort tid omsættes i naturen f.eks. af predatorer.

Kadaverne indsendes til DTU-VET og undersøgelsen foretages på en trachealsvaber og en kloaksvaber pr. fugl, disse kan pooles for hver fugl til en samlet prøve pr. fugl.

Tidshorisont, PCR resultat: 3 arbejdsdage efter modtagelse. For faldvildt en samlet maksimal svartid fra fund af en fugl til analyseresultat inkl. patogenicitetsbestemmelse foreligger på 8 arbejdsdage.

Resultatet sigter mod at informere om der påvises HPAI virus.

Tidshorisont, opfølgende virusisolering af H5/H7 positive prøver: op til 4-5 uger efter modtagelse. Virusisoleringen igangsættes indenfor 4-5 dage, men kan tage op til 4-5 uger.

2) Aktiv overvågning

Der etableres samarbejde med Ringmærkningscentralen under SNM, om indsamling af prøver bl.a. i forbindelse med ringmærkningsaktiviteter i 2016. De arter, der indsamles prøver fra, udvælges, så de bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, jf. bilag 1. Antallet af fugle/prøver der tilstræbes at indsamle, fremgår af nedenstående tabel. Der tilstræbes en geografisk fordeling af prøver så der i Hovedstadsregionen max. tages 150 prøver.

I fortsættelse af de tidligere års overvågning vil FVST udtage og indsamle prøver fra nedlagte ænder (gråand, krikand, pibeand) og gæs (gerne kortnæbbet gås), fortrinsvist i perioden 1/9 – 1/12 2016. Prøverne vil blive udtaget fra ænder og gæs indleveret på vildthåndteringsvirksomheder (Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling, og Klosterheden Vildt).

Prøverne vil blive indsamlet som kloaksvaber eller evt. fæcesvaber enkeltprøver i kloakmedie (flerstyrkemedie) og poollet i laboratoriet inden undersøgelse. Såfremt der er behov for analyse af enkeltprøver i en positiv pool, kan enkeltprøverne testes; der foretages alene undersøgelse af enkeltprøverne, hvis poolen giver et uklart resultat, hvilket kan være tilfældet ved tilstedeværelse af flere virus i samme pool.

Pooling i laboratoriet foretages således, at en pool kun indeholder max. 5 svabere indsamlet på samme dato, sted (på postnr. niveau) fra samme fugleart.

Fæcesvabere udtages ved at svabe en frisk fæceskat og overføre den til rør med 3 ml AI kloakmedie, hvor der er god sikkerhed for at fuglearten kan afgøres, dvs. klatter efter flokke af fugle der lige er lettet.

Tidshorisont: Primære resultater i løbet af 5 arbejdsdage (influenza A, H5 og H7, H5/H7 LPAI/HPAI) efter modtagelse. Sekundære resultater (subtypning af virusisolater) indenfor 4-5 uger, hvis der er tale om H5 eller H7 subtype og indenfor ca. 2 måneder, for andre H typers vedkommende. Afrapporteres i slutrapporten.

Resultat: sigter i første omgang mod at informere om der forekommer H5 eller H7 AI virus samt karakterisering af H5/H7 subtyper m.h.t. patogenicitet. Endvidere en kortlægning af forekomsten af andre subtyper AI virus i vilde danske fugle.

3) Molekylær karakterisering

Diversiteten af AI virus er stor og identifikation af specifikke virus-varianter kræver en nærmere karakterisering af virus, som giver mere information end subtypen. Formålet er hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af H7N9-China like virus, hurtig karakterisering af H5 virus, karakterisering af H5 og H7 virus med henblik på evaluering af egnetheden af de anvendte RT-PCR assays til H5/H7 subtypning, subtypebestemmelse af ikke-H5/H7/H9 virus.

Udover virus fra vilde fugle, kan øvrige AI virus, som er identificeret i fjerkræbesætninger mv. i forbindelse med fx AI mistanker og overvågningen i afkom fra opdrættet fjervildt, karakteriseres.

Tidshorisont: identifikation af H7N9-China virus ca. 5 arbejdsdage efter påvisning af H7. Resultatet af øvrige analyser rapporteres i slutrapporten.

Laboratoriemæssige undersøgelser

DTU-VET udfører alle analyser. De laboratoriemæssige procedurer for den passive (1) og aktive (2) overvågning er i overensstemmelse med Kommissionens Afgørelse¹ og den diagnostiske manual (Beslutning 2006/4377/EU). Ikke alle metoder til uddybende molekylær karakterisering (3) er beskrevet i den diagnostiske manual. Det ønskede prøveantal fremgår af nedenstående skema.

1) Overvågning og tidlig påvisning af HPAI virus i døde vilde fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5- og H7-positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver. Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-typning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

2) Screening for LPAI virus i levende vilde fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza inkl. undersøgelse af nedlagte fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5/H7 positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages virusisolation på pan-influenza positive prøver.

Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-subtypning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

3) Molekylær karakterisering

Udvalgte prøver fra den passive og aktive overvågning karakteriseres med sekvensanalyse og/eller RT-PCR af HA og evt. NA og øvrige gener. Der sigtes primært på karakterisering af H5 og H7 virus, sekundært på subtypebestemmelse af øvrige AI virus.

Løbende orientering om forløb

I 2. halvår indkalder FVST ved behov til møder (evt. i form af telefon- eller videolinkmøde) mellem FVST, SNM og DTU-VET om status på prøveantal, fund, eventuelle omfordelinger hvis det forventede antal fugle indenfor formålene ikke kan opnås, etc. Ved fravær af møder orienterer parterne hinanden pr. mail månedligt.

Afrapportering

DTU-VET sender resultaterne af den passive overvågning til FVST i form af laboratoriesvar og indtaster endvidere resultaterne i databasen for "Proveresultater for fugleinfluenza". Resultaterne er hermed tilgængelige på den offentlige vildfugleoversigt på FVST hjemmeside.

FVST foretager de ½-årige pligtige afrapporteringer til EU ultimo juli 2016 og ultimo januar 2017.

DTU-VET udarbejder en samlet slutrapport med resultaterne af den passive og aktive overvågning. Slutrapporten foreligger på dansk senest medio marts 2017.

FVST orienteres straks ved fund af HPAI virus. Fund af LPAI H7N9-China-2013 afrapporteres ligeledes hurtigst muligt, men kræver molekylær karakterisering og kan tage op til 5 arbejdsdage fra påvisning af H7 subtype.

Oversigt over antal fugle og prøver i overvågning af AI i vilde fugle i Danmark 2016

Opgave	Antal fugle	Antal prøver (pools)
<i>Aktiv overvågning i levende vilde fugle</i>		
SNM	450	150
FVST veterinærenheder (nedlagt fjervildt)	450	90
I alt	900	240
	Antal fugle (estimeret)	Antal prøver (estimeret)
<i>Passiv overvågning i døde vilde fugle</i>		
DTU-VET (faldvildt)		
NS		
FVST, Veterinærenheder		
I alt	25	25

Kontaktpersoner

Charlotte K. Hjulsgaard og Lars E. Larsen, DTU-VET.

Birgitte Beck Jørgensen og Pernille Dahl Nielsen, FVST.

Jesper Johannes Madsen og Kasper Thorup, SNM.

BILAG 1

Liste² over arter af vilde fugle, der skal gøres til genstand for målrettet prøveudtagning og testning for aviær influenza (målarter)

Nr.	Videnskabeligt navn	Almindeligt anvendt navn
1.	<i>Accipiter gentilis</i>	Duehøg
2.	<i>Accipiter nisus</i>	Spurvehøg
3.	<i>Anas acuta</i>	Spidsand
4.	<i>Anas clypeata</i>	Skeand
5.	<i>Anas crecca</i>	Krikand
6.	<i>Anas penelope</i>	Pibeand
7.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Gråand
8.	<i>Anas querquedula</i>	Atlingand
9.	<i>Anas strepera</i>	Knarand
10.	<i>Anser albifrons albifrons</i>	Blisgås (europæisk underart)
11.	<i>Anser anser</i>	Grågås
12.	<i>Anser brachyrhynchus</i>	Kortnæbbet gås
13.	<i>Anser erythropus</i>	Dværggås
14.	<i>Anser fabalis</i>	Sædgås
15.	<i>Ardea cinerea</i>	Fiskehejre
16.	<i>Aythya ferina</i>	Taffeland
17.	<i>Aythya fuligula</i>	Troldand
18.	<i>Branta bernicla</i>	Knortegås
19.	<i>Branta canadensis</i>	Canadagås
20.	<i>Branta leucopsis</i>	Bramgås
21.	<i>Branta ruficollis</i>	Rødhalset gås
22.	<i>Bubo bubo</i>	Stor hornugle
23.	<i>Buteo buteo</i>	Musvåge
24.	<i>Buteo lagopus</i>	Fjeldvåge
25.	<i>Cairina moschata</i>	Moskusand
26.	<i>Ciconia ciconia</i>	Hvid stork
27.	<i>Circus aeruginosus</i>	Rørhøg
28.	<i>Cygnus columbianus</i>	Pibesvane
29.	<i>Cygnus cygnus</i>	Sangsvane
30.	<i>Cygnus olor</i>	Knopsvane
31.	<i>Falco peregrinus</i>	Vandrefalk
32.	<i>Falco tinnunculus</i>	Tårnfalk
33.	<i>Fulica atra</i>	Blishøne
34.	<i>Larus canus</i>	Stormmåge

² Liste fra Kommissions beslutning nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle

- 35. | *Larus ridibundus* | Hættemåge |
- 36. | *Limosa limosa* | Stor kobbersneppe |
- 37. | *Marmaronetta angustirostris* | Marmorand | (findes ikke i DK)
- 38. | *Mergus albellus* | Lille skallesluger |
- 39. | *Milvus migrans* | Sort glente | (sjælden i DK)
- 40. | *Milvus milvus* | Rød glente |
- 41. | *Netta rufina* | Rødhovedet and |
- 42. | *Phalacrocorax carbo* | Skarv |
- 43. | *Philomachus pugnax* | Brushane |
- 44. | *Pica pica* | Husskade |
- 45. | *Pluvialis apricaria* | Hjejle |
- 46. | *Podiceps cristatus* | Toppet lappedykker |
- 47. | *Podiceps nigricollis* | Sorthalset lappedykker |
- 48. | *Porphyrio porphyrio* | Sultanhøne | (findes ikke i DK)
- 49. | *Tachybaptus ruficollis* | Lille lappedykker |
- 50. | *Vanellus vanellus* | Vibe |